

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/075644 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 21/77,**
21/64

KRESBACH, Gerhard, M. [DE/DE]; Burghaldenweg
6, D-79219 Staufen (DE). **NEUSCHÄFER, Dieter**
[DE/CH]; Pappelweg 6, CH-4132 Muttenz (CH).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/04869**

(74) **Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG;** Benken-
strasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. Mai 2000 (29.05.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
1047/99 5. Juni 1999 (05.06.1999) **CH**
689/00 6. April 2000 (06.04.2000) **CH**

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ZEPTOSENS AG** [CH/CH]; Benkenstrasse 254,
CH-4108 Witterswil (CH).

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): ABEL, Andreas, P.**
[CH/CH]; Rothbergstrasse 16a, CH-4054 Basel (CH). **BU-**
DACH, Wolfgang [DE/DE]; Auggener Strasse 3, D-79418
Schliengen (DE). **DUVENECK, Gert, L.** [DE/DE]; Ez-
mattenweg 34, D-79189 Bad Krozingen (DE). **EHRAT,**
Markus [CH/CH]; Im Brüel 6, CH-4312 Magden (CH).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(48) **Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten**
Fassung: 12. September 2002

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title: SENSOR PLATFORM AND METHOD FOR ANALYSING MULTIPLE ANALYTES**

(54) **Bezeichnung: SENSORPLATFORM UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG**

(57) **Abstract:** The invention relates to a variable configuration of a sensor platform, based on a planar thin-film waveguide, for determining one or more luminescences of one or more measuring areas on said sensor platform. The configuration comprises an optical film waveguide with a first optically transparent layer (a) on a second optically transparent layer (b) with a lower index of refraction than layer (a) and at least one grating structure for coupling excitation light into the measuring areas or coupling luminescent light out of said measuring areas. The invention also relates to an optical system for determining luminescence and to an analytical system comprising a sensor platform, an inventive optical system and supply means for bringing one or more samples into contact with the measuring areas on the sensor platform. The invention also relates to methods for determining luminescence and to the use of these methods.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer Sensorplattform basierend auf einem planaren Dünnschichtwellenleiter zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem oder mehreren Messbereichen auf dieser Sensorplattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer Gitterstruktur zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen oder Auskopplung von Lumineszenzlicht aus den Messbereichen. Ferner betrifft die Erfindung auch ein optisches System zur Lumineszenzbestimmung, sowie ein analytisches System, welches eine erfindungsgemässe Sensorplattform, ein erfindungsgemässes optisches System sowie Zuführungsmittel, um eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen, umfasst. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Lumineszenznachweisverfahren, sowie die Verwendung dieser Verfahren.

WO 00/075644 A1

**(15) Informationen zur Berichtigung:**

siehe PCT Gazette Nr. 37/2002 vom 12. September 2002,
Section II

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Sensorplattform und Verfahren zur Multianalytbestimmung

Die Erfindung betrifft eine variable Ausführungsform einer Sensorplattform basierend auf einem planaren Dünnschichtwellenleiter zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem oder mehreren Messbereichen auf dieser Sensorplattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer Gitterstruktur zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen. Die Erfindung betrifft auch ein optisches System zur Lumineszenzbestimmung mit einer Anregungslichtquelle, einer erfindungsgemässen Ausführung einer Sensorplattform und mindestens einem Detektor zur Erfassung des von den Messbereichen auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts sowie ein analytisches System, welches eine erfindungsgemässe Sensorplattform, ein erfindungsgemässes optisches System sowie Zuführungsmittel, um eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen, umfasst. Weitere Gegenstände der Erfindung sind Lumineszenznachweisverfahren mit erfindungsgemässen Sensorplattformen, optische Systeme und analytische Systeme sowie die Verwendung dieser Verfahren für die quantitative Affinitätssensorik sowie für verschiedene weitere Anwendungen.

Ziele der vorliegenden Erfindung sind die Bereitstellung von Sensorplattformen sowie von optischen und analytischen Messanordnungen für einen hochempfindlichen Nachweis eines oder mehrerer Analyten.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen planaren Dünnschichtwellenleiter ein, der von optisch dünneren Medien umgeben ist, so wird sie durch Totalreflexion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. Ein planarer Dünnschichtwellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Trägermaterial, wellenleitende Schicht, Superstrat (bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der elektromagnetischen Energie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als ein evaneszentes oder quergedämpftes Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst,

sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des geleiteten Lichts unterschieden werden.

Es sind verschiedene Verfahren für die Einkopplung von Anregungslicht in einen planaren Wellenleiter bekannt. Die am frühesten benutzten Verfahren beruhen auf Stirnflächenkopplung oder Prismenkopplung, wobei zur Verminderung von Reflexionen infolge von Luftspalten im allgemeinen eine Flüssigkeit zwischen Prisma und Wellenleiter aufgebracht wird. Diese beiden Methoden sind vor allem in Verbindung mit Wellenleitern relativ grosser Schichtdicke, d. h. insbesondere selbsttragenden Wellenleitern, sowie bei einem Brechungsindex des Wellenleiters von deutlich unter 2 geeignet. Zur Einkopplung von Anregungslicht in sehr dünne, hochbrechende wellenleitende Schichten ist demgegenüber die Verwendung von Koppelgittern eine wesentlich elegantere Methode.

Es können verschiedene Methoden zum Analytnachweis im evaneszenten Feld geführter Lichtwellen in optischen Schichtwellenleitern unterschieden werden. Aufgrund des eingesetzten Messprinzips kann man beispielsweise zwischen Fluoreszenz- oder allgemeiner Lumineszenzmethoden auf der einen Seite und refraktiven Methoden andererseits unterscheiden. Hierbei können Verfahren zur Erzeugung einer Oberflächenplasmonenresonanz in einer dünnen Metallschicht auf einer dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex in die Gruppe der refraktiven Methoden mit einbezogen werden, sofern als Basis zur Bestimmung der Messgrösse der Resonanzwinkel des eingestrahnten Anregungslichts zur Erzeugung der Oberflächenplasmonenresonanz dient. Die Oberflächenplasmonenresonanz kann aber auch zur Verstärkung einer Lumineszenz oder zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnissen in einer Lumineszenzmessung verwendet werden. Die Bedingungen zur Erzeugung einer Oberflächenplasmonenresonanz, sowie zur Kombination mit Lumineszenzmessungen, sowie mit wellenleitenden Strukturen sind vielfach in der Literatur beschrieben, beispielsweise in den US-Patenten US 5478755, US 5841143, US 5006716 und US 4649280.

Mit dem Begriff "Lumineszenz" wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet.

Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz, Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen.

Bei den refraktiven Messmethoden wird die Änderung des sogenannten effektiven Brechungsindex aufgrund molekularer Adsorption oder Desorption auf dem Wellenleiter zum Nachweis des Analyten benutzt. Diese Änderung des effektiven Brechungsindex wird, im Falle von Gitterkoppler-Sensoren, bestimmt aus der Änderung des Koppelwinkels für die Ein- oder Auskopplung von Licht in oder aus dem Gitterkoppler-Sensor, und im Falle von interferometrischen Sensoren aus der Änderung der Phasendifferenz zwischen dem in einem Sensorarm und einem Referenzarm des Interferometers geführten Messlichts.

Der Stand der Technik zum Einsatz von einem oder mehreren Koppelgittern zum Ein- und/oder Auskoppeln geführter Wellen mittels eines oder mehrerer Koppelgitter ist beispielsweise in K. Tiefenthaler, W. Lukosz, "Sensitivity of grating couplers as integrated-optical chemical sensors", J. Opt. Soc. Am. B6, 209 (1989); W. Lukosz, Ph.M. Nellen, Ch. Stamm, P. Weiss, "Output Grating Couplers on Planar Waveguides as Integrated, Optical Chemical Sensors", Sensors and Actuators B1, 585 (1990), und in T. Tamir, S.T. Peng, „Analysis and Design of Grating Couplers“, Appl. Phys. 14, 235-254 (1977), beschrieben.

Die genannten refraktiven Methoden haben den Vorteil, dass sie ohne Verwendung zusätzlicher Markierungsmoleküle, sogenannter molekularer Labels, eingesetzt werden können. Der Nachteil dieser labelfreien Methoden ist jedoch, dass die damit erzielbaren Nachweisgrenzen aufgrund der geringen Selektivität des Messprinzips, in Abhängigkeit von dem Molekulargewicht des Analyten auf pico- bis nanomolare Konzentrationsbereiche beschränkt sind, was für viele Anwendungen der modernen Spurenanalytik, beispielsweise für diagnostische Applikationen, nicht ausreichend ist.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen erscheinen lumineszenzbasierende Methoden aufgrund grösserer Selektivität der Signalerzeugung besser geeignet. Dabei ist die Lumineszenzanregung auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium, also auf die unmittelbare Umgebung des wellenleitenden Bereichs mit einer Eindringtiefe in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern ins

Medium beschränkt. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Für die Analytik ist die evaneszente Lumineszenzanregung von grossem Interesse, da die Anregung auf die direkte Umgebung der wellenleitenden Schicht beschränkt ist und störende Einflüsse aus der Tiefe des Mediums minimiert werden können.

Photometrische Instrumente zur Bestimmung der Lumineszenz von Biosensoren unter evaneszenten Anregungsbedingungen mit planaren optischen Wellenleitern sind ebenfalls bekannt und zum Beispiel in der WO 90/06503 beschrieben. Die dort verwendeten wellenleitenden Schichten sind 160 nm bis 1000 nm dick, die Einkopplung der Anregungswelle erfolgt ohne Gitterkoppler.

Es sind verschiedene Versuche unternommen worden, die Empfindlichkeit evaneszent angeregter Lumineszenz zu steigern und integrierte optische Sensoren herzustellen. So wird zum Beispiel in Biosensors & Bioelectronics 6 (1991), 595-607 über planare mono- oder nieder-modale Wellenleiter berichtet, die in einem zweistufigen Ionenaustauschverfahren hergestellt werden, und bei denen die Einkopplung der Anregungswelle mit Prismen erfolgt. Als Affinitätssystem wird humanes Immunoglobulin G / fluoresceinmarkiertes Protein A verwendet, wobei der Antikörper auf dem Wellenleiter immobilisiert und das nachzuweisende fluoresceinmarkierte Protein A in Phosphatpuffer einem Film aus Polyvinylalkohol zugesetzt wird, mit dem die Messregion des Wellenleiters überzogen wird.

Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass nur geringe Brechungsindexunterschiede zwischen wellenleitender Schicht und Substratschicht erreichbar sind, was eine verhältnismässig geringe Empfindlichkeit zur Folge hat.

Die Empfindlichkeit wird mit 20 nM fluoresceinmarkiertem Protein A angegeben. Um geringste Spuren bestimmen zu können, ist dies noch unbefriedigend und daher eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit notwendig. Darüberhinaus erscheint die Reproduzierbarkeit und praktische Durchführbarkeit der Lichteinkopplung durch Prismen aufgrund der grossen Abhängigkeit der Einkoppeleffizienz von Qualität und Grösse der Kontaktfläche zwischen Prisma und Wellenleiter schwierig.

In der US-A-5 081 012 wird ein anderes Prinzip vorgeschlagen. Die planare wellenleitende Schicht ist 200 nm bis 1000 nm dick und enthält zwei Gitter, von denen eines als Reflexionsgitter ausgebildet ist, so dass die eingekoppelte Lichtwelle den zwischen den Gittern liegenden Sensorbereich mindestens zweimal durchlaufen muss. Auf diese Weise soll eine erhöhte Empfindlichkeit erreicht werden. Ein Nachteil ist, dass die reflektierte Strahlung zu einer unerwünschten Erhöhung der Untergrund-Strahlungsintensität führen kann.

In der WO 91/10122 wird ein dünnschichtiger spektroskopischer Sensor beschrieben, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er ein Einkoppelgitter und ein räumlich entferntes Auskoppelgitter aufweist. Er eignet sich insbesondere zur Absorptionsmessung, wenn als wellenleitende Schicht ein hochbrechendes anorganisches Metalloxid verwendet wird. Es werden verschiedene Ausführungsformen beschrieben, welche zum Ein- und Auskoppeln von multichromatischen Lichtquellen geeignet sind. Die bevorzugte Dicke der wellenleitenden Schicht ist grösser als 200 nm und die Gittertiefe soll ca. 100 nm betragen. Diese Bedingungen sind für Lumineszenzmessungen in der Affinitätssensorik nicht geeignet, da nur eine geringe Empfindlichkeit erhalten wird. Dies wird in Appl. Optics Vol. 29, No. 31, (1990), 4583-4589 durch die Angaben der Gesamteffizienz bei 633 nm von 0,3% und bei 514 nm von 0,01% für diese Systeme bestätigt.

In einer anderen Ausführungsform desselben Sensors werden mehrere polymere planare wellenleitende Schichten auf einem Substrat aufgebracht, die als Gasgemischanalysator verwendet werden können. Man macht sich dabei die Änderung des effektiven Brechungsindex oder die Schichtdickenänderung des polymeren Wellenleiters beim Kontakt mit z. B. Lösungsmitteldämpfen zunutze. Die wellenleitende Struktur wird dabei physikalisch verändert. Derartige Änderungen sind jedoch für Lumineszenzmessungen in der Affinitätssensorik vollständig ungeeignet, da sich dadurch die Einkopplung ändert, zunehmende Streuung auftritt und die Empfindlichkeit deutlich abnehmen kann.

Es sind andere Anordnungen bekannt geworden, bei denen eine Lumineszenzverstärkung ohne direkte Einkopplung von Anregungslicht, aber vermittelt über Nahfeldeffekte durch Anregung lumineszenter Moleküle an oder nahe (d.h. im Abstand von bis zu einigen hundert Nanometern) der Oberfläche eines Wellenleiters erfolgen soll. So wird in der US 4649280 ein Mehrschichtsystem aus einem leitfähigen und reflektierenden Material (zum

Beispiel Silber) auf einem Substrat, einem dielektrischen optischen Wellenleiter (zum Beispiel aus Lithiumfluorid mit Brechungsindex von nur 1.39) und einem darauf abgeschiedenen Film fluoreszenzfähiger Moleküle beschrieben. In einer Weiterbildung wird in der US 5006716 zusätzlich vorgeschlagen, den leitfähigen Film in Form eines Oberflächen-Reliefgitters auszubilden, dessen Form sich im Laufe der Abscheideprozesse zur Erzeugung der Gesamtstruktur bis zur Oberfläche abbildet. Als Vorteil dieser Modifikation wird beschrieben, dass mittels des Gitters in die wellenleitende Schicht eingekoppeltes Lumineszenzlicht in diskrete Raumrichtungen, entsprechend den ausgekoppelten Beugungsordnungen und den im Wellenleiter geführten Moden, ausgekoppelt werden kann, so dass ein grösserer Anteil der Lumineszenz von einem Detektor erfasst werden kann, wenn er in Richtung des ausgekoppelten Lumineszenzlichts positioniert ist. Essentieller Bestandteil dieser Anordnungen mit einer wellenleitenden Schicht relativ niedrigen Brechungsindexes ist jedoch die Existenz der darunter befindlichen, reflektierenden Metallschicht.

Für eine reproduzierbare Herstellung erscheint ein einfacheres Zweischichtensystem, wie beispielsweise ein Dünnschichtwellenleiter, jedoch besser geeignet. Auch ist es wünschenswert, einen wellenleitenden Film mit möglichst hohem Brechungsindex zu verwenden, um damit die Intensität des evaneszenten Feldes zu steigern.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und WO 95/33198 beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz liegt darin, dass auf der als homogener Film ausgebildeten wellenleitenden Schicht der Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind fortlaufend aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dies gilt insbesondere, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dies im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als Ganzes verwendet werden muss.

Es besteht daher das Bedürfnis ein Verfahren zu entwickeln, welches es erlaubt, parallel, das heisst gleichzeitig oder direkt hintereinander ohne zusätzliche Reinigungsschritte, mehrere Proben zu analysieren.

In der WO 95/03538 wird zum Beispiel vorgeschlagen, über einer durchgehenden wellenleitenden Schicht mehrere Probenzellen anzubringen, die in Form von Vertiefungen in einer Probenplatte über der wellenleitenden Schicht ausgebildet sind. Unter jeder Probenzelle befindet sich ein Gitter, welches einen Teil des in der wellenleitenden Schicht geführten Lichtes auskoppelt. Der Nachweis des Analyten beruht auf der Änderung des Auskoppelwinkels in Abhängigkeit von der Analytkonzentration. Diese auf der Änderung des Brechungsindex basierenden Verfahren sind in der Regel deutlich weniger empfindlich als Lumineszenzverfahren.

In der WO 94/27137 wird beispielsweise eine Vorrichtung und ein Verfahren für die Durchführung von Immunoassays mittels evaneszent angeregter Fluoreszenz vorgeschlagen. Die Vorrichtung besteht aus einem durchgehenden optischen Wellenleiter mit zwei planparallelen Oberflächen und einer Seitenkante, die in Verbindung mit einer Linse als Einkoppelement wirkt. Auf mindestens einer Oberfläche sind eine Vielzahl von spezifischen Bindungspartnern immobilisiert. In einer bevorzugten Ausführungsform sind diese spezifischen Bindungspartner räumlich getrennt auf dem durchgehenden Wellenleiter angeordnet. Im Ausführungsbeispiel sind sie fleckenartig über die Wellenleiteroberfläche verteilt.

Anhand der offenbarten Ausführungsformen muss davon ausgegangen werden, dass die Einkoppeleffizienz über die Seitenkante niedriger ist als im Falle einer Gittereinkopplung, weiterhin ist wegen der grossen Schichtdicke

(selbsttragender Wellenleiter) die evaneszente Feldstärke und damit auch die Anregungseffizienz wesentlich niedriger als bei monomodalen Wellenleitern niedrigerer Schichtdicke. Insgesamt wird die Empfindlichkeit der Anordnung dadurch limitiert.

Diese Anordnungen, bei denen verschiedene spezifische Bindungspartner auf einer durchgehenden wellenleitenden Schicht aufgebracht sind, weisen auch den Nachteil auf, dass das Anregungslicht die Gesamtheit der fluorophormarkierten Moleküle anregt. Eine räumliche Auswahl von Messstellen ist so nicht möglich. Darüberhinaus können evaneszent rückgekoppelte Fluoreszenzphotonen zum Signal des Nachbarflecks beitragen und so zu Messfehlern führen.

In der integrierten Optik für Anwendungen in der Telekommunikation sind planare optische Bauelemente auf Glasbasis bekannt, die Wellenleiter in Kanalform enthalten, deren wellenleitende Kanäle durch Austausch einzelner Ionen an der Oberfläche unter Zuhilfenahme von Masken hergestellt werden (Glastechnische Berichte Vol. 62, Seite 285, 1989). Es resultiert eine physikalisch durchgängige Schicht, die in den mit Ionen dotierten Kanälen einen geringfügig erhöhten Brechungsindex aufweist. Die Erhöhung liegt in der Regel unter 5%. Die Herstellung derartiger Bauelemente ist aufwendig und teuer.

R. E. Kunz beschreibt in SPIE Vol 1587 Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors III (1991), Seiten 98 - 113 sich verzweigende und wieder zusammengeführte optische Wellenleiter, die vor allem für integrierte optische Geräte wie zum Beispiel Interferometer geeignet sind. Derartige Strukturen sind für die evaneszent angeregte Lumineszenzmessung ungeeignet, da man die Elemente nicht einzeln ansprechen kann, und durch die Anordnung mehrerer Verzweigungen hintereinander rasch hohe Intensitätsverluste der am ersten Zweig eingekoppelten Lichtwelle entstehen. Da der Öffnungswinkel solcher Verzweigungen klein ist, typisch sind 3° , sind die Abstände zwischen den zwei Ästen der Verzweigung bei kleinen Bauteilen gering oder die Bauteile müssen entsprechend grösser dimensioniert werden, was im allgemeinen unerwünscht ist. Darüberhinaus ist die feste Phasenbeziehung der verzweigten Wellen untereinander für Lumineszenzmessungen unnötig.

In der WO 99/13320 wird ein optischer Sensor zur Detektion von mindestens zwei unterschiedlichen Lichtanteilen beansprucht. Diese

Anmeldung bezieht sich vorwiegend auf refraktive Messmethoden, jedoch werden auch Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzmethoden zur Erzeugung des Messsignals beansprucht. In der WO 99/13320, welche sich auch auf Multianalytbestimmungen bezieht, werden eine Reihe unterschiedlicher Definitionen für die Erzeugung mehrerer "sensing pads", auch auf demselben physikalischen Bereich (Wellenleitergitterstruktur entsprechend der in der WO 99/13320 benutzten Nomenklatur) des beanspruchten Sensors, gegeben. Es wird jedoch kein Hinweis gegeben auf eine Anordnung mehrerer Messbereiche, nach der in unserer Anmeldung nachfolgenden Definition, auf einer durchgehend modulierten Gitterstruktur entsprechend der ebenfalls nachfolgenden Definition unserer Anmeldung. Weiterhin findet sich kein Hinweis darauf, wie ein störendes Übersprechen von Messlicht auf benachbarte Messbereiche, insbesondere von in die wellenleitende Schicht rückgekoppeltem Lumineszenzlicht, bei einer hohen Dichte von Messbereichen auf der Sensorplattform, verhindert werden kann.

Die Lösung dieses Problems ist von zentraler Bedeutung, um eine weitestmögliche Miniaturisierung der Sensorplattform zur Bereitstellung einer grösstmöglichen Anzahl verschiedener Messbereiche auf einer gemeinsamen Plattform zu erreichen.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierenden Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform relativ gross ist und daher wieder nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messfelder (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Es besteht daher der Bedarf nach einer Vergrösserung der Feature-Dichte bzw. nach einer Verkleinerung der erforderlichen Fläche pro Messbereich.

Basierend auf einfachen Glas- oder Mikroskop-Plättchen, ohne zusätzliche wellenleitende Schichten, sind Arrays mit einer sehr hohen Feature-Dichte bekannt. Beispielsweise werden in der US 5445934 (Affymax Technologies)

Arrays von Oligonukleotiden mit einer Dichte von mehr als 1000 Features pro Quadratzentimeter beschrieben und beansprucht. Die Anregung und das Auslegen solcher Arrays beruht auf klassischen optischen Anordnungen und Methoden. Es kann das ganze Array gleichzeitig mit einem aufgeweiteten Anregungslichtbündel beleuchtet werden, was jedoch zu einer relativ geringen Empfindlichkeit führt, da der Streulichtanteil relativ gross ist und Streulicht oder Untergrundfluoreszenzlicht aus dem Glassubstrat auch in den Bereichen erzeugt wird, in denen sich keine zur Bindung des Analyten immobilisierten Oligonukleotide befinden. Um die Anregung und Detektion auf die Bereiche der immobilisierten Features zu beschränken und Lichterzeugung in den Nachbarbereichen zu unterdrücken, werden vielfach konfokale Messanordnungen eingesetzt und die verschiedenen Features sequentiell mittels "Scannen" ausgelesen. Dieses hat jedoch einen grösseren Zeitaufwand zum Auslesen eines grossen Arrays und einen relativ komplexen optischen Aufbau zur Folge.

Es besteht daher das Bedürfnis nach einer Ausgestaltung der Sensorplattform und nach einer optischen Messanordnung, womit eine ebenso hohe Empfindlichkeit erzielt werden kann, wie diese mit Sensorplattformen basierend auf Dünnschichtwellenleitern erreicht wurde, und mit der zugleich die Messfläche pro Feature minimiert werden kann.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass bei geeigneter Wahl der Parameter, insbesondere der Gittertiefe, einer an einen Messbereich angrenzenden Gitterstruktur (c') auf einer Sensorplattform mit wellenleitender Schicht (a), in welche Anregungslicht über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelt wurde, das in die Schicht (a) rückgekoppelte Lumineszenzlicht über kürzeste Strecken, d.h. wenige hundert Mikrometer vollständig ausgekoppelt und damit an einer weiteren Ausbreitung in der wellenleitenden Schicht (a) gehindert wird.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte Messbereiche (d) durch die Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen zur Erkennung eines oder mehrerer Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben. Verschiedene Messbereiche können durch Gitterstrukturen (c) und (c') voneinander getrennt sein, wenn ein störendes Übersprechen von in benachbarten Messbereichen erzeugtem und in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht verhindert werden soll. Sie

können sich auch auf einer gemeinsamen, durchgehenden Gitterstruktur befinden, was, in Abhängigkeit von der Koppeffizienz des Gitters, zu einer teilweisen oder vollständigen Verhinderung eines störenden Übersprechens von Lumineszenz führt.

Um gleichzeitig mehrere Analyten in einer Probe nachzuweisen, kann es von Vorteil sein, zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der Sensorplattform zusammenzufassen. Verschiedene Segmente können durch Gitterstrukturen (c) und (c') voneinander getrennt sein, wenn ein Übersprechen von in benachbarten Segmenten erzeugtem und die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht verhindert werden soll. Zusätzlich können verschiedene Segmente durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Sensorplattform zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),

mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)

mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und

auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass ein Übersprechen von in den Messbereichen oder in den mehrere Messbereiche umfassenden Segmenten erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder benachbarte Segmente mittels an die Messbereiche oder an die Segmente angrenzender

Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Periode wie die Gitterstrukturen (c) zur Auskopplung des Lumineszenzlichts verhindert wird.

Da sich das in die optisch transparente, wellenleitende Schicht (a) rückgekoppelte Lumineszenzlicht isotrop in dieser ausbreitet, ist es möglich, über ein- und dieselbe Gitterstruktur sowohl Anregungslicht in die wellenleitende Schicht einzukoppeln und rückgekoppeltes Lumineszenzlicht aus dieser auszukoppeln. Eine Gitterstruktur (c) oder (c') kann also sowohl als Einkoppel- als auch als Auskoppelgitter verwendet werden. Weiterhin können auch die Gitterstrukturen (c) und (c') in ihrer Funktion vertauscht werden, d. h., die Gitterstrukturen (c) und (c') können wechselseitig als Ein- und / oder Auskoppelgitter verwendet werden.

Um ein Übersprechen rückgekoppelten und sich in der optisch transparenten Schicht (a) isotrop ausbreitenden Lumineszenzlichts zwischen benachbarten Messbereichen oder benachbarten Segmenten nicht nur in Ausbreitungsrichtung des geführten Anregungslichts, sondern auch senkrecht dazu zu verhindern, ist es von Vorteil, wenn die Gitterstrukturen (c) und (c') räumlich getrennte Messbereiche (d)) oder räumlich getrennte Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, umschliessen.

Bevorzugt wird dabei eine kreis-, rechteck- oder polygonförmige Anordnung der Gitterstrukturen (c) und (c'), um die Messbereiche oder Segmente.

In der einfachsten Ausführungsform begrenzen die Gitterstrukturen (c) und (c') einen Messbereich oder ein Segment nur in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts. Dann sind sie vorteilhaft parallel zueinander ausgerichtet. Insbesondere können die Gitterstrukturen (c) und (c') auch eine gemeinsame durchgehende Gitterstruktur bilden, auf der sich mehrere Messbereiche oder Segmente befinden.

Da sowohl das Anregungslicht als auch rückgekoppeltes Lumineszenzlicht mit einer geeigneten Gitterstruktur (c), deren Ein- und Auskoppel-effizienz im wesentlichen durch die geeignete Wahl der Gittertiefe bestimmt wird, bereits am Ort der Einkopplung wieder ausgekoppelt werden, ist es möglich, eine sehr hohe Dichte von Messbereichen auf einer gemeinsamen Gitterstruktur zu schaffen. Die erreichbare Dichte wird dabei im wesentlichen von der minimalen Grösse der Spots bestimmt, welche bei der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen

Erkennungselementen erzielt werden kann. Die eingesetzten Sensorplattformen können dabei Flächen von mehreren Zentimetern Seitenlänge haben. Es ist daher möglich, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche auf einer Sensorplattform angeordnet sind. Ein einzelner Messbereich kann dabei eine Fläche von $0.001 - 6 \text{ mm}^2$ einnehmen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),

mit einer im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereiche oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)

- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und

ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

Diese Anordnung der erfindungsgemässen Sensorplattform zeichnet sich zusätzlich durch den Vorteil aus, dass die Intensität des störenden Transmissionslichts beim Erreichen des Einkoppelwinkels ein Minimum hat, d.h. nahezu vollständig verschwindet, was bei Einstrahlung des Anregungslichts von der Rückseite der Sensorplattform, d.h. eintretend durch die optisch transparente Schicht (b) in Richtung der Gitterstruktur, das nicht zur Lumineszenzanregung dienende Anregungslicht in einem optischen System minimiert. Die physikalischen Bedingungen für das Verschwinden des Transmissionslichts und das gleichzeitige Auftreten einer aussergewöhnlichen "Reflektion" (als Summe aus dem regulären Anteil der Reflektion, entsprechend den Strahlungsgesetzen, und dem über die Gitterstruktur ausgekoppelten Licht) werden beispielsweise in D. Rosenblatt et al., "Resonant Grating Waveguide Structures", IEEE Journal of Quantum Electronics, Vol. 33 (1997) 2038 – 2059 beschrieben und erklärt.

Für Anwendungen, in denen die Anforderungen an die Empfindlichkeit verringert sind, kann es von Vorteil sein, wenn das Anregungslicht nicht unter Einkoppelbedingungen, sondern in einer einfachen Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird. Auch dann wird es zu einer Verstärkung der Lumineszenz im Nahfeld des optischen Schichtwellenleiters kommen, und eine hohe Featuredichte ohne ein optisches Übersprechen von Signalen aus benachbarten Messbereichen kann wiederum durch Auskopplung der Signale mittels der Gitterstruktur erzielt werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch eine Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),

- mit einer im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereiche oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c)

- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und
ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

In vielen Anwendungen, insbesondere aus dem Bereich der Biologie, ist es erwünscht, zu Zwecken der Referenzierung mit einer Kontrollsubstanz oder der Kalibration, Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge und Luminophore unterschiedlicher Anregungswellenlänge und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge, oder Anregungslicht gleicher Wellenlänge und Luminophore unterschiedlicher Emissionswellenlänge zu verwenden.

Dazu ist es von Vorteil, wenn die im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder Segmente durchgehend modulierte Gitterstruktur eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien ist, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Höhe der Ausbreitungsverluste eines in einer optisch wellenleitenden Schicht (a) geführten Modes wird in hohem Masse von der Oberflächenrauigkeit einer darunter liegenden Trägerschicht sowie von Absorption durch möglicherweise in dieser Trägerschicht vorhandene

Chromophoren bestimmt, was zusätzlich das Risiko der Anregung unerwünschter Lumineszenz in dieser Trägerschicht, durch Eindringen des evaneszenten Feldes des in der Schicht (a) geführten Modes, in sich birgt. Weiterhin kann es zum Auftreten thermischer Spannungen infolge unterschiedlicher thermischer Ausdehnungskoeffizienten der optisch transparenten Schichten (a) und (b) kommen. Im Falle einer chemisch empfindlichen optisch transparenten Schicht (b), sofern sie beispielsweise aus einem transparenten thermoplastischen Kunststoff besteht, ist es wünschenswert, ein Eindringen von Lösungsmitteln, welche die Schicht (b) angreifen könnten, durch eventuell in der optisch transparenten Schicht (a) vorhandene Mikroporen zu verhindern.

Daher ist es von Vorteil, wenn sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet. Die Zwischenschicht hat die Aufgabe einer Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter der Schicht (a) oder der Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a) geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten oder einer Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten oder der Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der optischen Sensorplattform oder der chemischen Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf die optisch transparente Schicht (a). Beispielsweise kann dieses durch physikalische Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Die Orientierung der Erkennungselemente ist dann im allgemeinen statistisch. Ausserdem besteht die Gefahr, dass bei unterschiedlicher Zusammensetzung der den Analyten enthaltenden Probe oder der im Nachweisverfahren eingesetzten Reagentien ein Teil der immobilisierten Erkennungselemente fortgespült wird. Daher kann es von Vorteil sein, wenn zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Diese Haftvermittlungsschicht sollte ebenfalls optisch transparent sein. Insbesondere sollte die Haftvermittlungsschicht nicht über

die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes aus der wellenleitenden Schicht (a) in das darüber liegende Medium hinausragen. Daher sollte die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, haben. Sie kann beispielsweise chemische Verbindungen aus der Gruppe Silane, Epoxide, "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfassen.

Wie in der Definition der Messbereiche festgestellt, ist es möglich, durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform räumlich getrennte Messbereiche (d) zu erzeugen. Im Kontakt mit einem lumineszenzfähigen Analyten oder eines mit dem Analyten um die Bindung an die immobilisierten Erkennungselemente konkurrierenden lumineszenzmarkierten Analogen des Analyten oder eines weiteren lumineszenzmarkierten Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay werden diese lumineszenzfähigen Moleküle nur selektiv in den Messbereichen an die Oberfläche der Sensorplattform binden, welche durch die Flächen definiert werden, die von den immobilisierten Erkennungselementen eingenommen werden.

Zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen können eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet werden.

Als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen können Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (DNA, RNA, ...), Nukleinsäureanaloge (PNA ..), Antikörpern, Aptameren, membran-gebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigene für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird.

Unter der letztgenannten Art von Erkennungselementen sind Kavitäten zu verstehen, die in einem Verfahren hergestellt werden, welches als "molecular imprinting" in der Literatur beschrieben wurde. Dazu wird,

meistens in organischer Lösung, der Analyt oder ein Analogon des Analyten, in einer Polymerenstruktur eingekapselt. Man bezeichnet ihn dann als "Imprint". Dann wird der Analyt oder sein Analogon unter Zugabe geeigneter Reagentien aus der Polymerenstruktur wieder herausgelöst, so dass er dort eine leere Kavität zurücklässt. Diese leere Kavität kann dann als eine Bindungsstelle mit hoher sterischer Selektivität in einem späteren Nachweisverfahren eingesetzt werden.

Es ist auch möglich, dass als biochemische oder biologische Erkennungselemente ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden. In vielen Fällen wird die Nachweisgrenze eines analytischen Verfahrens limitiert durch Signale sogenannter unspezifischer Bindung, d. h. durch Signale, welche durch Bindung des Analyten oder anderer zum Nachweis des Analyten eingesetzter Verbindungen erzeugt werden, welche nicht nur im Bereich der eingesetzten immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen, sondern auch in davon unbedeckten Bereichen einer Sensorplattform gebunden werden, beispielsweise durch hydrophobe Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist es von Vorteil, wenn zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen zur Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind. Als "chemisch neutrale" Verbindungen werden dabei solche Stoffe bezeichnet, welche selbst keine spezifischen Bindungsstellen zur Erkennung und Bindung des Analyten oder eines Analogon des Analyten oder eines weiteren Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay aufweisen und durch ihre Anwesenheit den Zugang des Analyten oder seines Analogon oder der weiteren Bindungspartner zur Oberfläche der Sensorplattform blockieren.

Als "chemisch neutrale" Verbindungen können beispielsweise Stoffe aus den Gruppen eingesetzt werden, die von Rinderserumalbumin bzw. Polyethylenglycol gebildet wird.

Für viele Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist. Der Resonanzwinkel zur Einkopplung des Anregungslichts über die Gitterstruktur (c) zu den Messbereichen ist dann im gesamten Bereich der Gitterstruktur einheitlich. Will man jedoch beispielsweise das Anregungslicht verschiedener Lichtquellen mit deutlich unterschiedlicher Wellenlänge einkoppeln, so können sich die entsprechenden Resonanzwinkel für die Einkopplung

deutlich unterscheiden, was die Verwendung zusätzlicher Justierelemente in einem optischen System zur Aufnahme der Sensorplattform erforderlich machen kann oder zu räumlich sehr ungünstigen Koppelwinkeln führen kann. Beispielsweise zur Verringerung stark unterschiedlicher Koppelwinkel kann es daher von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

Zur Relaxierung der Anforderungen an die Parallelität des Anregungslichtbündels und die genaue Einstellung des Resonanzwinkels kann es von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist. Dann wird aus einem grossflächig eingestrahlten, konvergenten oder divergenten Strahlenbündel eine Einkopplung an dem Ort auf der Gitterstruktur erfolgen, an dem die Resonanzbedingung erfüllt ist.

Insbesondere ermöglicht eine solche Gitterstruktur mit senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierender Periodizität ein Verfahren, in dem neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden. Dabei kann es von Vorteil sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden.

Zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses kann es weiterhin von Vorteil sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) kann aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe bestehen, die von Polycarbonat, Polyimid oder Polymethyl-methacrylat gebildet wird.

Zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an der Oberfläche der optisch transparenten Schicht (a) ist es wünschenswert, dass der Brechungsindex der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) wesentlich grösser als der Brechungsindex der benachbarten Schichten ist. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 2 ist.

Beispielsweise kann die erste optisch transparente Schicht (a) aus TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 bestehen. Besonders bevorzugt wird, wenn die erste transparente optische Schicht (a) aus TiO_2 , oder Ta_2O_5 besteht.

Neben dem Brechungsindex der wellenleitenden optisch transparenten Schicht (a) ist deren Dicke der zweite massgebliche Parameter zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an deren Grenzflächen zu benachbarten Schichten mit niedrigerem Brechungsindex. Dabei nimmt die Stärke des evaneszenten Feldes mit abnehmender Dicke der wellenleitenden Schicht (a) zu, solange die Schichtdicke ausreicht, um mindestens einen Mode der Anregungswellenlänge zu führen. Dabei ist die minimale "Cut-off"-Schichtdicke zur Führung eines Modes abhängig von der Wellenlänge dieses Modes. Sie ist für längerwelliges Licht grösser als für kurzwelliges Licht. Mit Annäherung an die "Cut-off"-Schichtdicke nehmen allerdings auch ungewünschte Ausbreitungsverluste stark zu, was die Auswahl der bevorzugten Schichtdicke zusätzlich nach unten begrenzt. Bevorzugt sind solche Schichtdicken der optisch transparenten Schicht (a), welche nur die Führung von 1 bis 3 Moden einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ermöglichen, ganz besonders bevorzugt sind Schichtdicken, welche in monomodalen Wellenleitern für diese Anregungswellenlänge führen. Dabei ist klar, dass sich der diskrete Modencharakter des geführten Lichts nur auf die transversalen Moden bezieht.

Diese Anforderungen führen dazu, dass vorteilhaft die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 bis 300 nm beträgt. Ganz besonders vorteilhaft beträgt die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 70 bis 160 nm.

Bei vorgegebenen Brechungsindices der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) und der benachbarten Schichten ist der Resonanzwinkel für die Einkopplung des Anregungslichts entsprechend der oben genannten Resonanzbedingung abhängig von der einzukoppelnden Beugungsordnung, der Anregungswellenlänge sowie der Gitterperiode. Zur Erhöhung der Einkoppleffizienz ist die Einkopplung der ersten Beugungsordnung vorteilhaft. Neben der Höhe der Beugungsordnung ist für die Höhe der Einkoppleffizienz die Gittertiefe massgeblich. Prinzipiell vergrössert sich die Koppleffizienz mit steigender Gittertiefe. Da der

Prozess der Auskopplung völlig reziprok zur Einkopplung erfolgt, erhöht sich jedoch zugleich auch die Auskoppelleffizienz, so dass es zur Anregung von Lumineszenz in einem auf der Gitterstruktur (c) angeordneten oder an diese angrenzenden Messbereich (d), in Abhängigkeit von der Geometrie der Messbereiche und der eingestrahnten Anregungslichtbündel ein Optimum gibt. Aufgrund dieser Randbedingungen ist es von Vorteil, wenn das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.

Wie in dem weiter unten aufgeführten Ausführungsbeispiel zu dieser Erfindung gezeigt wird, ist es möglich, auf einer durchgehenden Gitterstruktur durch unvollständige Ein- und Auskopplung von Anregungs- und / oder rückgekoppeltem Lumineszenzlicht parallel zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts einen über die Gittertiefe kontrollierbaren positiven Gradienten der Intensität des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche zu erzeugen. Dieser Gradient entsteht dadurch, dass über den betreffenden gleichzeitig unter Einkoppelbedingungen mit einem aufgeweiteten, weitgehend parallelen Anregungsbündel bestrahlten Bereich der Gitterstruktur ein geringerer Anteil von Anregungslicht ausgekoppelt wird, als in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts zusätzlich eingekoppelt wird. Als Folge erhöht sich unter diesen Bedingungen die bis zum Ende des beleuchteten Bereich auf der durchgehenden Gitterstruktur, in Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts, die verfügbare Gesamtanregungsintensität. Dieser Gradient der Intensität verfügbaren Anregungslichts hat den Vorteil, dass er zu einer Erweiterung des dynamischen Bereichs ausgenutzt werden kann.

Die Ein- und Auskoppelleffizienz eines diffraktiven Gitters ist unter festgelegten übrigen Parametern im wesentlichen bestimmt durch die Gittertiefe. Daher kann der besagte Gradient der Intensität des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts zusätzlich beeinflusst und kontrolliert werden, wenn das Gitter (c) in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts eine räumlich variierende Gittertiefe aufweist.

Ausbreitungsverluste des eingekoppelten Anregungslichts in einer optisch transparenten, wellenleitenden Schicht führen demgegenüber zu einem negativen Gradienten des geführten Anregungslichts in dessen Ausbreitungsrichtung. Entsprechend kann durch eine gezielte Festlegung der

Höhe dieser Ausbreitungsverluste, beispielsweise durch eine gezielte Dotierung der wellenleitenden Schicht mit absorbierenden, aber mit der zu erzeugenden Lumineszenz nicht interferierenden Molekülen oder mittels Aufbringung solcher absorbierender Moleküle auf der wellenleitenden Schicht ein kontrollierbarer negativer Gradient der Intensität des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche erzeugt werden.

Weiterhin wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

Dabei kann die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) sein.

Zur Verstärkung einer Lumineszenz oder zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses kann es weiterhin von Vorteil sein, wenn zwischen der optisch transparenten Schicht (a) und den immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer zusätzlichen dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex als der Schicht (a), beispielsweise aus Silica oder Magnesiumfluorid, aufgebracht ist, wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen weiteren Zwischenschicht so ausgewählt ist, dass ein Oberflächenplasmon bei der Anregungswellenlänge und / oder der Lumineszenzwellenlänge angeregt werden kann.

Weiterhin kann es von Vorteil sein, wenn auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein optisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einer Sensorplattform nach mindestens einer der genannten Ausführungen

- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Für Anwendungen, in denen nicht höchste Ansprüche an die Empfindlichkeit gestellt werden, kann es vorteilhaft sein, wenn das Anregungslicht in einer einfachen Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird. Dieses hat deutlich verminderte Anforderungen an die Positionierung der erfindungsgemässen Sensorplattform in einem optischen System zur Folge. Insbesondere ermöglicht dieses auch den Einsatz der Sensorplattform in einer Vielzahl bereits auf dem Markt befindlicher Lumineszenzanregungs- und -detektionssysteme, wie beispielsweise Scannersystemen. Dabei wird bevorzugt, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

Zur Erreichung tiefster Nachweisgrenzen ist es jedoch von Vorteil, wenn das Anregungslicht unter Einkoppelbedingungen auf die Gitterstruktur (c) oder (c') eingestrahlt wird.

Dabei ist es von Vorteil, wenn das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

Um eine Vielzahl von Messbereichen oder alle Messbereiche gleichzeitig anzuregen und deren Lumineszenz gleichzeitig zu bestimmen, wird es bevorzugt, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird, wobei dieses bevorzugt unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) erfolgt.

Zur Verminderung von Lumineszenzsignalen ausserhalb der Messbereiche kann es jedoch auch vorteilhaft sein, wenn das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen

möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf räumlich getrennte Messbereiche eingestrahlt werden.

Im Falle unzureichender Intensität einer einzigen Lichtquelle oder des Bedarfs nach Lichtquellen unterschiedlicher Emissionswellenlängen, beispielsweise für biologische Applikationen ist es vorteilhaft, wenn als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere kohärente Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden. Im Falle von Lichtquellen unterschiedlicher Emissionswellenlänge ist es dabei von Vorteil, wenn das Anregungslicht von 2 oder mehr kohärenten Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.

Um die Signale von einer Vielzahl von Messbereichen getrennt aufzunehmen, wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird.

Dabei kann als der mindestens eine ortsauflösende Detektor mindestens ein Detektor aus der Gruppe verwendet werden, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

In dem erfindungsgemässen optischen System nach einer der genannten Ausführungen können zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform nach einer der vorgenannten Ausführungen und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Für eine Reihe von Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.

Für kinetische Messungen oder für die Diskriminierung rasch abklingender Fluoreszenz von fluoreszenten Verunreinigungen in der Probe oder in Materialien von Komponenten des optischen Systems oder der Sensorplattform selbst kann es von Vorteil sein, wenn das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

Weiterhin wird es bevorzugt, dass das erfindungsgemässe optische System Komponenten umfasst, mit denen zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden. Besonders von Vorteil ist dabei, wenn die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

Es ist auch möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt. Dabei kann die sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgen, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird. Üblicherweise werden für sequentielle Anregung und Detektion in bioanalytischen Array-Systemen kommerziell erhältliche sogenannte Scanner eingesetzt, mit denen, meistens mittels beweglicher Spiegel, ein Anregungslichtstrahl sequentiell über die zu untersuchende Fläche geführt wird. Bei den meisten Scannersystemen ändert sich dabei der Winkel zwischen der beleuchteten Fläche und dem Anregungslichtstrahl. Zur Erfüllung der Resonanzbedingung für die Einkopplung des Anregungslichts in die wellenleitende Schicht der erfindungsgemässen Sensorplattform muss dieser Winkel jedoch im wesentlichen konstant bleiben, d. h. ein in dem erfindungsgemässen optischen System zu verwendender Scanner muss winkelgetreu arbeiten. Diese Forderung wird von einigen kommerziell erhältlichen Scannern erfüllt. Zugleich darf sich jedoch auch nicht die Grösse der angeregten Fläche auf der Sensorplattform ändern. Daher ist ein

weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein optisches System, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

Eine andere mögliche Ausführungsform ist, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird. In diesem Fall können die eine oder mehreren Anregungslichtquellen und die zur Detektion verwendeten Komponenten räumlich fixiert sein.

Gegenstand der Erfindung ist ein sich ableitendes vollständiges analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer Sensorplattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter, mit

- einer Sensorplattform nach einer der vorgenannten Ausführungsformen,
- einem optischen System nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, sowie
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

Vorteilhaft umfasst das analytische System zusätzlich eine oder mehrere Probenbehältnisse, welche mindestens im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder der zu Segmenten zusammengefassten Messbereiche zur Sensorplattform hin geöffnet sind. Dabei können die Probenbehältnisse jeweils ein Volumen von 0.1 nl – 100 µl definieren.

Die Sensorplattform kann sowohl in einem geschlossenen Fliesssystem als auch in einem offenen System betrieben werden. Im ersten Fall ist das analytische System so gestaltet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im Falle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

Im Falle eines offenen Systems ist das erfindungsgemäße analytische System so gestaltet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen. Zusätzlich können Behältnisse für Reagentien vorgesehen sein, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen auf einer Sensorplattform zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
- mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)
- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass ein Übersprechen von in den Messbereichen oder in den mehrere Messbereiche umfassenden Segmenten erzeugt und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder benachbarte Segmente mittels an die Messbereiche oder an die Segmente angrenzender Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Periode wie die Gitterstrukturen (c) zur Auskopplung des Lumineszenzlichts verhindert wird.

Insbesondere Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum gleichzeitigen Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer

oder mehreren Proben auf einem mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen auf einer Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
 - mit einem im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereichen oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c)
 - mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
 - auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,
- dadurch gekennzeichnet, dass

- die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und
- ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche oder Segmente durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

Dabei wird bevorzugt, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.

Bei den vorgenannten Verfahren ist es möglich, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz

oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

Gegenstand dieser Erfindung ist auch ein Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten entsprechend den voranstehenden Ausführungen, unter Verwendung eines analytischen Systems nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, welches ein optisches System nach mindestens einer der vorgenannten Ausführungsformen mit einer Sensorplattform nach mindestens einer der vorgenannten Ausführungsformen umfasst, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere flüssige Proben, welche auf den einen oder die mehreren Analyten untersucht werden sollen, mit einem oder mehreren Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt gebracht werden, Anregungslicht in die Messbereiche geleitet wird, hierbei lumineszenzfähige Stoffe in den Proben oder auf den Messbereichen zur Lumineszenz angeregt und die abgestrahlte Lumineszenz gemessen wird.

Als eine Weiterbildung wird ein Verfahren beansprucht, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass mittels eines kontrollierbaren Gradienten des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche, parallel zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, der dynamische Bereich für die Signalerfassung und / oder quantitative Analytbestimmung erweitert oder beschränkt werden kann.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann zur Erzeugung der Lumineszenz oder Fluoreszenz ein Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel verwendet werden, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

Bei den Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln kann es sich um herkömmliche Lumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe oder auch um sogenannte lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel, basierend auf Halbleitern (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science* 281 (1998) 2016 – 2018) handeln.

Das Lumineszenzlabel kann an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die

biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden sein.

Zusätzlich können ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden. Hierbei kann es vorteilhaft sein, wenn das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

Für andere Applikationen ist es vorteilhaft, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzlabel nur wenig oder gar nicht überlappen.

In dem erfindungsgemässen Verfahren kann es weiterhin vorteilhaft sein, wenn zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzlabel zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzlabel verwendet wird.

Zusätzlich kann es von Vorteil sein, wenn neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden. Von weiterem Vorteil kann dabei sein, wenn die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden. Weiterhin erlaubt das Verfahren die Möglichkeit, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Das erfindungsgemässe Verfahren nach einer der voranstehenden Ausführungsformen ermöglicht eine gleichzeitige oder sequentielle, quantitative oder qualitative Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-Tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Die zu untersuchenden Proben können natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb sein.

Eine zu untersuchende Probe kann aber auch eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe sein.

Die zu untersuchenden Proben können auch aus biologischen Gewebeteilen entnommen sein.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Verfahrens nach mindestens einer der voranstehenden Ausführungsformen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und Forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und Forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Mit den nachfolgenden Ausführungsbeispielen soll die Erfindung genauer erläutert und demonstriert werden.

Beispiel 1:

a)

Sensorplattform mit 2 getrennten Gitterstrukturen und mehreren Messbereichen und einem Segment von Messbereichen

Es wurde eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 16 mm Breite x 48 mm Länge x 0.5 mm Dicke verwendet. Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b)) bestand aus Corning Glas 7059

(Brechungsindex $n = 1.538$ bei 488 nm). Im Substrat wurden mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten wellenleitenden Schicht (a) und anschliessendes nasschemisches Ätzen unter Abdeckung der nicht zu strukturierenden Bereiche der Sensorplattform 2 Strukturen von Oberflächenreliefgittern einer Periode von 320 nm und einer Tiefe von $12 \pm 3 \text{ nm}$ erzeugt. Die Gitter hatten eine Abmessung von 5 mm Länge x 12 mm Breite (Gitterstruktur I) bzw. 1 mm Länge x 12 mm Breite (Gitterstruktur II), mit Orientierung der Gitterlinien parallel zur ausgewiesenen Breite. Die Gitterstrukturen waren, zentralsymmetrisch bezüglich deren Innenseiten für das einzukoppelnde und in der wellenleitenden Schicht (a) zu führenden Anregungslichts, in einem Innenabstand von 20 mm auf der Sensorplattform angeordnet. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) auf der optisch transparenten Schicht (b) wurde durch "Ion Plating" und anschliessendes Tempern bei 300°C erzeugt (siehe R. E. Kunz, J. Edlinger et al., "Grating Couplers in tapered waveguides for integrated optical sensing", in Proc. SPIE vol. 2068 (1994), S. 321), und hatte einen Brechungsindex von 2.317 bei 488 nm (Schichtdicke 150 nm). Die Gittertiefen auf der wellenleitenden Schicht, in die sich die Gitterstruktur infolge des Abscheidungsprozesses nahezu masstäblich im Verhältnis $1:1$ überträgt, wurden später mittels AFM kontrolliert. In dem späteren Ausführungsbeispiel (4.b) Messverfahren) dienen die Gitterstrukturen (I) als durchgehende Gitterstrukturen zur Einkopplung des Anregungslichts zu den darauf befindlichen Messbereichen bzw. zu den zwischen den Gitterstrukturen (I) und (II) befindlichen Messbereichen, welche, zusammengefasst als Segment, durch Auskoppeln geführten, rückgekoppelten Lumineszenzlichts und geführten Anregungslichts durch Gitterstruktur (II), von Übersprechen in potentielle weitere in dieser Ausbreitungsrichtung befindliche Messbereiche oder Segmente, anzuordnen nach der hier als Auskopplungsgitter dienenden Gitterstruktur (II) abgetrennt sind.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wurden die Sensorplattformen gereinigt und mit Epoxysilan in Flüssigphase (10 ml ($2 \% \text{ v/v}$) 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und 1 ml ($0.2 \% \text{ v/v}$) N-Ethyl-diisopropylamin in 500 ml Ortho-Xylene ($d = 0.881 \text{ g/cm}^3$; $m = 440.5 \text{ g}$)) silanisiert. Danach wurden mit einem kommerziellen Spotter (GESIM) Lösungen von 16-mer Oligonukleotiden (NH₂-3'CAACACACCTTAACAC-5', Konzentration der abgeschiedenenen Lösung: 0.34 mM , 3 nl pro Spot) aufgebracht und damit annähernd

kreisförmige Messbereiche eines Durchmessers von 140 – 150 μm in einem Abstand von 600 μm (Zentrum-zu-Zentrum) in einem 6 x 6-Array sowohl auf der Gitterstruktur (I) als auch im Bereich zwischen den Gitterstrukturen (I) und (II) erzeugt.

b)

Sensorplattform mit mehreren Messbereichen auf einer durchgehenden Gitterstruktur

Es wurde eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 16 mm Breite x 48 mm Länge x 0.7 mm Dicke verwendet. Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b) bestand aus AF 45 Glas (Brechungsindex $n = 1.52$ bei 633 nm). Im Substrat wurde mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten wellenleitenden Schicht (a) und anschliessendes nasschemisches Ätzen eine durchgehende Struktur eines Oberflächenreliefgitters einer Periode von 364 nm und einer Tiefe von 25 +/- 5 nm erzeugt, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zur ausgewiesenen Breite der Sensorplattform. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) auf der optisch transparenten Schicht (b) aus Ta_2O_5 wurde durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern (siehe DE 4410258) erzeugt und hatte einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Die Gittertiefen auf der wellenleitenden Schicht, in die sich die Gitterstruktur infolge des Abscheidungsprozesses nahezu masstäblich im Verhältnis 1:1 überträgt, wurden später mittels AFM kontrolliert.

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wurden die Sensorplattformen gereinigt und mit Epoxysilan in Flüssigphase silanisiert, wie oben beschrieben. Danach wurden mit einem kommerziellen Spotter Lösungen von 16-mer Oligonukleotiden (Konzentration der abgeschiedenenen Lösung: 0.34 mM, 3 nl pro Spot) aufgebracht und damit anähernd kreisförmige Messbereiche eines Durchmessers von 140 - 150 μm in einem Abstand (Zentrum zu Zentrum) von 600 μm in einem 6 x 6-Array auf der durchgehenden Gitterstruktur erzeugt.

Beispiel 2

Optisches System

a) Anregungseinheiten

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation mit Drehpunkt in der Achse des auf die Gitterstruktur (I) auftreffenden Anregungslichtflecks zur Einkopplung in die in Beispiel 1a genannte Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Anregungseinheit a.i) / Sensorplattform 1.a)

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers (2 mW) wird ohne Verwendung weiterer strahlformender Komponenten auf die rechte Kante der Gitterstruktur I geleitet. Der Anregungslichtfleck entspricht in seiner Grösse dem Durchmesser des anregenden Laserstrahls. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, was an maximaler Intensität des Streulichts erkennbar ist, welches längs des eingekoppelten Modes geführten Anregungslichts durch Streuung abgestrahlt wird. Dieses Maximum kann sowohl durch visuelle Bestimmung als auch durch Abbildung des mit einem Abbildungssystem erfassten Streulichts längs des Anregungsmodes auf einen optoelektronischen Detektor, z. B. auf die Pixels einer CCD-Kamera als Beispiel eines ortsauflösenden Detektors oder einer Photodiode als Beispiel eines nicht ortsauflösenden Detektors, bestimmt werden. Unter denselben Einkoppelbedingungen misst man mit einem zweiten optoelektronischen Detektor unter dem Auskoppelwinkel für das geführte Anregungslicht an der zweiten Gitterstruktur II ebenfalls ein maximales Signal. Als Resonanzwinkel für die Einkopplung wird ein Winkel von -3.8° bestimmt.

Anregungseinheit a.ii) / Sensorplattform 1.a)

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers (2 mW) wird mit einer Linsenkombination, unter Verwendung einer Zylinderlinse, zu einem spaltförmigem Lichtstrahl (parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform) aufgeweitet. Die oberen und unteren Randgebiete des parallel zu den Gitterlinien leicht divergenten, in der dazu senkrechten Projektion jedoch parallelen Anregungslichts werden durch einen Spalt ausgeblendet. Das resultierende Lichtbündel mit spaltförmigem Querschnitt auf der Gitterstruktur wird auf die rechte Kante der Gitterstruktur I geleitet. Der Anregungslichtfleck hat eine Grösse von 1 mm Länge x 12 mm Breite. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, was an maximaler Intensität des Streulichts erkennbar ist, welches längs des eingekoppelten Modes geführten Anregungslichts durch Streuung abgestrahlt wird. Dieses Maximum kann man sowohl durch visuelle Bestimmung als auch durch Abbildung des mit einem Abbildungssystem erfassten Streulichts längs des Anregungsmodes auf einen optoelektronischen Detektor, z. B. auf die Pixels einer CCD-Kamera als Beispiel eines ortsauflösenden Detektors oder einer Photodiode als Beispiel eines nicht ortsauflösenden Detektors, bestimmen. Unter denselben Einkoppelbedingungen misst man mit einem zweiten optoelektronischen Detektor unter dem Auskoppelwinkel für das geführte Anregungslicht an der zweiten Gitterstruktur II ebenfalls ein maximales Signal. Als Resonanzwinkel für die Einkopplung wird ein Winkel von -3.9° bestimmt.

Anregungseinheit a.iii) / Sensorplattform 1.a)

Das Anregungslicht eines Helium-Neon-Lasers wird mit einem Dammann-Gitter in parallel zu den Gitterlinien linear angeordnete 16 Teilstrahlen zerlegt. Die ungleichförmige Abfolge von Nuten und Stegen des Dammann-Gitters war vom Hersteller so optimiert worden, dass alle geradzahlgigen Beugungsordnungen, insbesondere die nullte Ordnung, unterdrückt wurden und in den ungeradzahlgigen Beugungsordnungen möglichst gleiche Intensität (mit einer Variation von weniger als 5 %) erzielt wurde. Eine asphärische Linse nach dem Dammann-Gitter in Richtung der Sensorplattform, in deren Brennpunkt sich das Dammann-Gitter befindet, wird benutzt, um aus den nach dem Dammann-Gitter divergenten Teilstrahlen ein Bündel von parallelen Teilstrahlen zu erzeugen. Die Divergenz der nach dem Dammann-Gitter austretenden Teilstrahlen und die Brennweite der dahinter befindlichen Linse können so aufeinander abgestimmt werden, dass ein gewünschter Strahlabstand auf der

Sensorplattform erzeugt wird. Im vorliegenden Beispiel wurden mit dem verwendeten Dammann-Gitter 16 Teilstrahlen erzeugt, von denen, nach Passieren einer spaltförmigen Blende, 8 Teilstrahlen über ein Umlenkprisma auf die rechte Kante der als Einkoppelgitter diendenden Gitterstruktur I geleitet wurden. Die Einkoppelbedingung konnte für alle 8 Teilstrahlen gleichzeitig erfüllt werden, was an gleichzeitiger maximaler Intensität des längs der eingekoppelten und in der wellenleitenden Schicht (a) geführten Teilstrahlen erzeugten Streulichts zu erkennen war. Der Koppelwinkel betrug -3.8° .

Anregungseinheit a.iv) / Sensorplattform 1.a)

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm wird mit einer 25-fachen Aufweitungsoptik auf ein paralleles Strahlenbündel mit kreisförmigem Querschnitt von 2 cm Durchmesser aufgeweitet. Hiervon wird eine Fläche von 1 mm Länge x 9 mm Breite (entsprechend den Bezeichnungen für die Gitterstrukturen) aus dem zentralen Teil des Anregungslichtbündels ausgewählt und über ein Umlenkprisma auf die rechte Kante der Gitterstruktur I (in Richtung des einzukoppelnden und zu führenden Anregungslichts) geleitet. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, was an maximaler Intensität des Streulichts erkennbar ist, welches längs des eingekoppelten Modes geführten Anregungslichts durch Streuung abgestrahlt wird. Dieses Maximum kann man sowohl durch visuelle Bestimmung als auch durch Abbildung des mit einem Abbildungssystem erfassten Streulichts längs des Anregungsmodes auf einen optoelektronischen Detektor, z. B. auf die Pixels einer CCD-Kamera als Beispiel eines ortsauflösenden Detektors oder einer Photodiode als Beispiel eines nicht ortsauflösenden Detektors, bestimmen. Unter denselben Einkoppelbedingungen misst man mit einem zweiten optoelektronischen Detektor unter dem Auskoppelwinkel für das geführte Anregungslicht an der zweiten Gitterstruktur II ebenfalls ein maximales Signal.

Als Resonanzwinkel für die Einkopplung wird ein Winkel von -3.8° bestimmt. Die ungebeugt durchtretende Lichtmenge wird mit einem Laser-Powermeter hinter der Position der Sensorplattform gemessen. Als verfügbare Anregungsintensität wird (ohne im Strahlengang befindliche Sensorplattform) ein Wert von $88 \mu\text{W}$ bestimmt. Mit dazwischen befindlicher Sensorplattform, aber ohne Einkopplung in die wellenleitende Schicht, beträgt die Transmission $79 \mu\text{W}$. Bei Erfüllung der Einkopplung

verringert sich dieser Wert auf $21 \mu\text{W}$, d. h. 24 % des insgesamt verfügbaren Anregungslichts.

Anregungseinheit a.v) / Sensorplattform 1.a)

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm wird mit einer 25-fachen Aufweitungsoptik auf ein paralleles Strahlenbündel mit kreisförmigem Querschnitt von 2 cm Durchmesser aufgeweitet. Hiervon wird eine Fläche von 4 mm Länge x 9 mm Breite (entsprechend den Bezeichnungen für die Gitterstrukturen) aus dem zentralen Teil des Anregungslichtbündels ausgewählt und über ein Umlenkprisma zunächst auf die rechte Kante der Gitterstruktur I (in Richtung des einzukoppelnden und zu führenden Anregungslichts) geleitet. Die Sensorplattform wird auf maximale Einkopplung justiert, welche an dem längs des eingekoppelten Modes geführten Anregungslichts durch Streuung abgestrahltem Licht erkennbar ist. Als Resonanzwinkel für die Einkopplung wird ein Winkel von -4° bestimmt. Dann wird die Sensorplattform, ohne Änderung des Winkels, lateral so verschoben, dass das die 4 mm lange Anregungslichtfläche sich in der Mitte der 5 mm langen Gitterstruktur befindet. Die ungebeugt durchtretende Lichtmenge wird mit einem Laser-Powermeter hinter der Position der Sensorplattform gemessen. Als verfügbare Anregungsintensität wird (ohne im Strahlengang befindliche Sensorplattform) ein Wert von $250 \mu\text{W}$ bestimmt. Mit dazwischen befindlicher Sensorplattform, aber ohne Erfüllung der Koppelbedingung, beträgt die Transmission $240 \mu\text{W}$. Bei Erfüllung der Einkopplung verringert sich dieser Wert auf $51 \mu\text{W}$, d. h. 20 % des insgesamt verfügbaren Anregungslichts.

b) Detektionseinheiten

(i) Detektionssysteme für die gleichzeitige Ausmessung mehrerer Messbereiche

(I) Als ortsauflösender Detektor diente eine CCD-Kamera (TE3/A Astrocams, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur -30°C). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgte mit einem 35 mm Nikon-Objektiv (Nikkor 35 mm). Zwischen dem Objektiv und dem CCD-Chip, in einem Strahlengang nur geringer Konvergenz, die die Wirkungsweise der Interferenzfilter nicht wesentlich beeinträchtigte, befanden sich 2 Interferenzfilter (Omega Optical, Brattleborough, Vermont)

mit Zentralwellenlänge von 679 nm und 25 nm Bandbreite. Die unter Zufuhr des Hybridisierungspuffers, ohne lumineszente Tracer-Probe erfassten, zeitversetzt zum Lumineszenzsignal bei der Hybridisierung mit komplementären, lumineszenzmarkierten Tracermolekülen aufgenommenen, orts aufgelösten Signale dienten sowohl zur Festlegung des Hintergrundsignals als auch zur Referenzierung.

(II) Als ortsauflösender Detektor diente eine CCD-Kamera (TE3/A Astrocams, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur -30°C). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgte mit einem Heligon-Tandem-Objektiv (Rodenstock, zweimal XR Heligon 1.1/50 mm). Zwischen den beiden Hälften des Heligon-Tandem-Objektivs befanden sich, auf einem Filterrads montiert, 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 679 nm und 25 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge wurden alternierend gemessen.

(III) Als ortsauflösender Detektor diente eine CCD-Kamera (TE3/A Astrocams, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur -30°C). Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgte mit einem Heligon-Tandem-Objektiv wie im vorigen Beispiel. Zwischen den beiden Hälften des Heligon-Tandem-Objektivs befanden sich, in Ausbreitungsrichtung des Emissionsstrahlenganges in Richtung Detektor, zunächst eine Strahlteilerplatte unter 45° zur rechtwinkligen Reflektion des mittels Fresnel-Reflektion reflektierten Lichtanteils (vorwiegend bestehend aus Licht bei der Anregungswellenlänge) und nachfolgend 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 679 nm und 25 nm Bandbreite zur selektiven Transmission von Lumineszenzlicht. Das über die Strahlteilerplatte aus dem Emissionsstrahlengang ausgespiegelte Licht wurde entweder direkt oder nach Durchgang durch einen Interferenzfilter für die Anregungswellenlänge auf einen ortsauflösenden Detektor oder einen nicht ortsauflösenden Detektor geleitet. Die Referenzsignale, welche wie in den obigen Beispielen zur Detektionseinheit jeweils die gleichen Bereiche auf der Sensorplattform erfassen, wurden gleichzeitig mit den Lumineszenzsignalen aus den Messbereichen erfasst.

(ii). Detektionssystem für sequentielle Ausmessung von Messbereichen

Der abzubildende Messbereich der Sensorplattform befindet sich im Fokus eines Linsensystems, welches in einer 1:1 Abbildung den Messbereich auf eine Blende abbildet, mit der Bereiche ausserhalb des betreffenden Messbereichs ausgeblendet werden können. Die Blende befindet sich ihrerseits im Brennpunkt der ersten eines aus mindestens 2 Linsen bestehenden Systems, so dass danach, in Richtung des Detektors, wieder ein paralleler Strahlengang erzeugt wird. Im parallelen Strahlengang befindet sich zunächst eine Strahlteilerplatte unter 45° zum parallelen Strahlengang, mit der mittels Fresnel-Reflektionen ein Teil des erfassten Lichts, welches vorwiegend gestreutes Licht bei der Anregungswellenlänge umfasst, in Richtung des Referenzdetektors, z. B. einer Photodiode mit nachgeschaltetem Verstärker, reflektiert, gegebenenfalls nach Durchgang durch einen Interferenzfilter bei der Anregungswellenlänge. Das nach der Strahlteilerplatte sich weiter ausbreitende Lumineszenzlicht wird mittels zweier Interferenzfilter (Omega Optical, 679 DF25) selektiert und auf den Detektor fokussiert, als welcher ein selektierter Photomultiplier, in Verbindung mit einer Photon Counting Einheit dient (Hamamatsu H6240-02 select).

Zur sequentiellen Aufnahme von Signalen von verschiedenen Messbereichen wird die Sensorplattform mittels der unter Beispiel 2.a) beschriebenen Justierelemente in x- und y-Richtung verschoben.

Es kann auch eine Kombination von gleichzeitiger Anregung mehrerer Messbereiche und Signaldetektion mittels ortsauflösender Detektoren und Translationsschritten zur Erfassung grösserer Teile der Sensorplattform, als in einem einzigen Schritt anregbar und detektierbar, vorgenommen werden.

Beispiel 3

Analytisches System

Alle nachfolgend aufgeführten Beispiele sind so konzipiert, dass die Sensorplattformen mit den zugeordneten Probenbehältnissen als ganzes oder teilweise und das fluidische Zuführungssystem ganz oder teilweise thermostatisiert werden können.

(a) Eine einzelne durchgehende, geschlossene Flusszelle + Fluidiksystem
Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1a) verwendet mit einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2 a.iv). Die Detektionseinheit ist gemäss Beispiel 2.b.i.I) ausgebildet. Für die sequentielle Zugabe verschiedener Reagentien und der Proben in einem geschlossenen Fliesssystem wird ein geschlossenes Probenbehältnis mit einer zur Sensorplattform offenen Probenkammer verwendet, welche den gesamten Bereich einschliesslich der Gitterstrukturen I und II, mit einer Breite von 8 mm, einschliesst. Das Material des Probenbehältnisses besteht vorteilhaft aus einem selbsthaftenden, formflexiblen und fluidisch dichtenden, fluoreszenzfreien und reflexionsarmen Kunststoff, im Ausführungsbeispiel aus geschwärztem Polydimethylsiloxan. Die Tiefe der Probenkammer beträgt 0.1 mm, so dass das Gesamtvolumen der Probenkammer etwa 25 μ L umfasst. Die durchgehende Probenkammer dient der gleichzeitigen Applikation ein- und derselben Probe oder Reagentien zu allen Messbereichen. Am linken und rechten Rand der Probenkammer, auf der Sensorplattform gegenüberliegenden Seite, befinden sich 2 Öffnungen, die wechselseitig als Ein- oder Auslass benutzt werden können. Die Zufuhr der Probe und Reagentien erfolgt mit Spritzenpumpen (Cavro XL 3000, Cavro, Sunnyvale, CA, USA) mit einer Dosiergenauigkeit von 1 μ l – 10 μ l, in Abhängigkeit von der Spritzengrösse. Die Spritzenpumpen sind Teil eines Fluidiksystems, welches weiterhin einen kommerziellen Autosampler (Gilson 231 XL), ein oder mehrere Mehrwege-Ventile und eine Sample-Loop umfasst. Durch Schalten des einen oder mehrerer Ventile und Transport durch die Pumpen können verschiedene Reagentien oder Proben zu den Messbereichen geleitet werden.

(b) Flusszelle mit 5 parallelen, geschlossenen Fliesskanälen + Fluidiksystem

Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1a) verwendet mit einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2 a.ii). Die Detektionseinheit ist gemäss Beispiel 2.b.i.I) ausgebildet. Für die sequentielle Zugabe verschiedener Reagentien und der Proben in einem geschlossenen Fliesssystem wird eine geschlossene Flusszelle mit 5 parallelen, zur Sensorplattform offenen Probenkammern von jeweils 1 mm Breite, in einem Abstand von je 1 mm, verwendet, welche sich bis über die Gitterstrukturen I und II hinaus erstrecken. Die Tiefe der Probenkammer beträgt 0.1 mm, so dass das Gesamtvolumen der Probenkammern jeweils etwa 2.5 μ L umfasst. Die 5

Probenkammern dienen der Applikation gleicher oder unterschiedlicher Proben oder Reagentien zu den von oben adressierten Messbereichen. Am linken und rechten Rand der Probenkammern, auf der der Sensorplattform gegenüberliegenden Seite, befinden sich jeweils 2 Öffnungen, die wechselseitig als Ein- oder Auslass benutzt werden können. Die Zufuhr der Probe und Reagentien erfolgt mit Spritzenpumpen (Cavro XL 3000, Cavro, Sunnyvale, CA, USA) mit kleinen Spritzengrößen 50 µl – 250 µl, mit denen eine Dosiergenauigkeit von etwa 0.5 µl erreicht werden kann. Die Spritzenpumpen sind Teil eines Fluidiksystems, welches weiterhin einen kommerziellen Autosampler (Gilson 231 XL), ein oder mehrere Mehrwege-Ventile und ein oder mehrere Sample-Loop umfasst. Durch Schalten des einen oder mehrerer Ventile und Transport durch die Pumpen können verschiedene Reagentien oder Proben zu den Messbereichen geleitet werden.

c) Nach aussen offene Probengefäße zur individuell adressierbaren Zugabe von Reagentien

Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1b) verwendet mit einer über die ganze Sensorplattform ausgebildeten monodiffraktiven Gitterstruktur, und einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2 a.v). Die Detektionseinheit ist gemäss Beispiel 2.b.i.I) ausgebildet.

Um die Zugabe oder Entnahme von Proben und Reagentien in individuell adressierbare, offene Probenbehältnisse zu ermöglichen, ist die Sensorplattform waagrecht angeordnet. Die Struktur für die Probenbehältnisse wird gebildet aus einer 1 bis 3 mm starken, selbsthaftenden und fluidisch dichtenden, flexiblen Platte aus geschwärztem Polydimethylsiloxan, in welche eine Vielzahl von durchgehenden Aussparungen (mit typischen Durchmessern von 1 mm – 3 mm) eingebracht wurden, welche geometrisch den fluidisch individuell zu adressierenden Messbereichen oder zu Segmenten zusammengefassten Messbereichen

insbesondere im Falle von leichtflüchtigen Proben oder Reagentien, die Fluidik-Applikationsschritte unter einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre durchgeführt.

Der Dispenser ist Teil eines Fluidiksystems, welches weiterhin einen kommerziellen Autosampler (Gilson 231 XL), ein oder mehrere Mehrwege-Ventile und eine Sample-Loop umfasst. Durch Schalten des einen oder mehrerer Ventile und Transport durch die Pumpen können verschiedene Reagentien oder Proben zu den Messbereichen geleitet werden.

d) Proben- und Reagentienzugabe mittels eines Dispensers, ohne weitere Probenbehältnisse

Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1b) verwendet mit einer über die ganze Sensorplattform ausgebildeten monodiffraktiven Gitterstruktur, und einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2.a.v). Die Detektionseinheit ist gemäss Beispiel 2.b.i.I) ausgebildet.

Um die Zugabe oder Entnahme von Proben und Reagentien zu den individuell zu adressierenden Messbereichen oder Segmenten zu ermöglichen, ist die Sensorplattform waagrecht angeordnet. Gleiche oder unterschiedliche Proben und Reagentien werden, individuell adressiert, mit einem Einzel- oder Mehrfach-Parallel-Dispenser auf die Messbereiche oder Segmente appliziert oder von diesen abgesogen. Zur Vermeidung von Verdunstung werden, insbesondere im Falle von leichtflüchtigen Proben oder Reagentien, die Fluidik-Applikationsschritte unter einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre durchgeführt.

Der Dispenser ist Teil eines Fluidiksystems, welches weiterhin einen kommerziellen Autosampler (Gilson 231 XL), ein oder mehrere Mehrwege-Ventile und eine Sample-Loop umfasst. Durch Schalten des einen oder mehrerer Ventile und Transport durch die Pumpen können verschiedene Reagentien oder Proben zu den Messbereichen geleitet werden.

Beispiel 4

Verfahren zum Lumineszenznachweis

4.a) Verwendete Lösungen:

1) Hybridisierungspuffer (pH 7.7), bestehend aus 326 mL 0.070 M Phosphatpuffer (pH 7), 29.5 g KCL, 0.09 g EDTA x 2 H₂O, 2.25 g Poly(acrylic acid) 5100 sodium salt, 2.25 g Tween 20, 1.13 g Natriumazid, aufgefüllt auf 4.5 l mit destilliertem Wasser und auf pH 7.7 eingestellt mit 1-molarer Natronlauge.

2) Probenlösung (16*c-Cy5): Cy5-markiertes, zu dem in den Messbereichen immobilisierten Oligomeren komplementäres, aus 16 Basenpaaren bestehendes Oligomer (Cy5-5'-GTTGTGTGGAATTGTG-3' (10^{-9} M) in Hybridisierungspuffer 1)

3) Regenerierungslösung: 0.22 g Natriumchlorid, 0.11 g Natriumcitrat (sodium citrate), 2.5 g Tween 20, 142 g Formamid und 0.13 g Natriumazid, gelöst in 250 mL deionisiertem Wasser.

4.b) Messverfahren:

(i) Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1a) verwendet mit einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2.a.v) sowie einer Detektionseinheit gemäss Beispiel 2.b.i.I) und einer geschlossenen Flusszelle gemäss Beispiel 3.a).

Das Messverfahren besteht aus folgenden Einzelschritten:

- 5 Minuten Waschen mit Hybridisierungspuffer 1) (0.5 ml/min), Aufnahme des Untergrundsignals;
- 5 Minuten Zuführung der Probenlösung (1 nM 16*c-Cy5; 0.5 ml/min);
- 5 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer
- 5 Minuten Zufuhr der Regenerierungslösung (0.5ml/min)
- 5 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer (Re-Equilibrierung)

Während des Verfahrens werden in einem Zeitabstand von jeweils einer Minute Kamerabilder der Sensorplattform mit den darauf befindlichen Messbereichen bei der Luminezenzwellenlänge aufgenommen.

(ii) Es wird eine Sensorplattform gemäss Beispiel 1b) verwendet mit einer Anregungseinheit gemäss Beispiel 2.a.v) sowie einer Detektionseinheit gemäss Beispiel 2.b.i.I) und einer geschlossenen Flusszelle gemäss Beispiel 3.a).

Das Messverfahren besteht aus folgenden Einzelschritten:

- 5 Minuten Waschen mit Hybridisierungspuffer 1) (0.5 ml/min), Aufnahme des Untergrundsignals;
- 5 Minuten Zuführung der Probenlösung (1 nM (16*c-Cy5; 0.5 ml/min);
- 5 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer (1 nM
- 5 Minuten Zufuhr der Regenerierungslösung (0.5ml/min)
- 5 Minuten Spülen mit Hybridisierungspuffer (Re-Equilibrierung)

Während des Verfahrens werden in einem Zeitabstand von jeweils einer Minute Kamerabilder der Sensorplattform mit den darauf befindlichen Messbereichen bei der Luminezenzwellenlänge aufgenommen.

4.c) Ergebnisse

(i) Nachfolgend werden beispielhaft Ergebnisse nach dem Messverfahren 4.b.i) diskutiert. Zunächst war der aufgeweitete Anregungslichtstrahl, unter Einkoppelbedingungen, auf die Mitte der Gitterstruktur I gerichtet, und erzeugte dort eine direkt beleuchtete Fläche von 4 mm Länge x 9 mm Breite. Von den 6 x 6 Messbereichen (Spalten x Zeilen) wurde die unterste Zeile nicht in der Auswertung berücksichtigt, da sie am Rande der Flusszelle lag und daher die Analytzufuhr nicht unter gleichen Bedingungen wie für die übrigen Messbereiche erfolgte. Es ergaben sich nach der Hybridisierungsphase folgende durchschnittliche Netto-Lumineszenzsignale, als Differenz zwischen dem Absolutsignalen und den Background-Signalen in diesen Messbereichen (Tabelle 1, Einheit: "counts per second, cps"):

Tabelle 1:

Spalte	1	2	3	4	5	6
Zeile 1	14800	19350	21100	33000	34300	39000
Zeile 2	15600	18410	21800	34900	38010	38300
Zeile 3	14600	17700	19700	32600	32700	41400
Zeile 4	14900	20700	19700	27200	36900	42100
Zeile 5	13500	16300	19100	23700	31000	41300
Durchschnitt	14680	18492	20280	30280	34582	40420
Standardabweichung, %	5.2	9.0	5.5	15.4	8.4	4.1

Im Falle der in diesem Beispiel benutzten Sensorplattform 1.a) mit einer Gittertiefe von 12 ± 3 nm war die Effizienz von Ein- und Auskopplung des Anregungslichts unvollständig, was zu einem positiven Gradienten der Intensität des verfügbaren Anregungslichts, in Richtung des geführten Modes, führte. Dieses führt mit einem Anstieg der beobachteten Lumineszenzsignale mit steigender Spaltenzahl in Tabelle 1. Zur graphischen Visualisierung ist in Abbildung 1 beispielhaft der Verlauf der Brutto-Lumineszenzsignale, also vor Abzug der Background-Signale, längs der Zeile 5 der Messbereiche, entsprechend obiger Tabelle, dargestellt.

Im weiteren Verlauf des Messverfahrens 4.b.i. wurde die Sensorplattform ohne Veränderung des Winkels so weit in Längsrichtung verschoben, dass ein Teil des Anregungslichtes, welches nahe der rechten Kante der Gitterstruktur I eingekoppelt wurde, sich weiter in der optisch transparenten Schicht a) in Richtung der Gitterstruktur II ausbreiten konnte, wo es dann ausgekoppelt wurde. Beim Durchlaufen des Bereiches zwischen den beiden Gitterstrukturen I und II wurde das zweite, zwischen diesen Gitterstrukturen liegende 6×6 Array von Messbereichen, als Beispiel für ein Segment von Messbereichen, angeregt. Die obersten zwei Zeilen des Arrays befanden sich am oberen Rand des Probenbehältnisses. Die Signale aus den betreffenden Messbereichen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Es ergaben sich nach der Hybridisierungsphase folgende durchschnittliche Netto-Lumineszenzsignale, als Differenz zwischen dem Absolutsignalen und

den Background-Signalen in diesen Messbereichen (Tabelle 2, Einheit: "counts per second, cps"):

Tabelle 2:

Spalte	1	2	3	4	5	6
Zeile 3	27174	18900	18230	17964	13080	11943
Zeile 4	27900	19410	19025	17950	16130	14500
Zeile 5	26033	21530	20667	17025	15217	13000
Zeile 6	24274	22290	17949	16621	14265	11700
Durchschnitt	26345	21076	18968	17390	14673	12786
Standardabweichung (%)	6.0	5.8	6.4	3.9	8.9	10.0

Die Ausbreitungsverluste in der optisch transparenten Schicht (a) zwischen den Gitterstrukturen (I) und (II), entsprechend einem negativen Gradienten der Intensität verfügbaren geführten Anregungslichts, waren in diesem Beispiel recht gross und führten zu einer deutlichen Verringerung der Netto-Lumineszenzsignale mit steigender Ausbreitungslänge des geführten Anregungslichts bzw. steigender Spaltenzahl der Messbereiche (siehe Tabelle 2). Zur graphischen Visualisierung ist in Abbildung 2 beispielhaft der Verlauf der Brutto-Lumineszenzsignale, also vor Abzug der Background-Signale, längs der Zeile 5 der Messbereiche, entsprechend obiger Tabelle, dargestellt.

Im weiteren Verlauf dieses Messverfahrens wurde der Einstellwinkel der Sensorplattform bezüglich der Normalen von -4° , was zu einem bezüglich obiger Abbildungen sich nach rechts ausbreitenden Mode geführten Anregungslichts in der optisch transparenten Schicht (a) führt, auf $+4^\circ$ umgestellt. Damit ist die Einkoppelbedingung zur Erzeugung eines sich nach links ausbreitenden Modes erfüllt.

Unter den Versuchsbedingungen konnten damit 4 Spalten des 6×6 Arrays von Messbereichen auf der Gitterstruktur I unter Einkoppelbedingungen angeregt werden. Aufgrund der unvollständigen Effizienz der Ein- und Auskopplung stellt sich damit ein nach links ansteigender Gradient der

Intensität geführten verfügbaren Anregungslichts ein, wie beispielhaft aus dem Verlauf der Brutto-Lumineszenzsignale, also vor Abzug der Background-Signale, längs der Zeile 5 der Messbereiche in Abbildung 3 zu entnehmen ist.

(ii) Nachfolgend werden beispielhaft Ergebnisse nach dem Messverfahren 4.b.ii) diskutiert. Der aufgeweitete Anregungslichtstrahl wurde, unter Einkoppelbedingungen, auf ein Array von Messbereichen gerichtet, das auf der vollständig mit einer einheitlichen Gitterstruktur durchmodulierten Sensorplattform aufgebracht worden war.

Aufgrund der grösseren Gittertiefe von 25 ± 5 nm war die Effizienz von Ein- und Auskopplung des Anregungslichts wesentlich grösser, was zu einem nur sehr geringen positiven Gradienten der Intensität des verfügbaren Anregungslichts, in Richtung des geführten Modes, führte, dessen Effekt kaum die statistische Schwankung der Messergebnisse übersteigt. Zur graphischen Visualisierung ist in Abbildung 4 beispielhaft der Verlauf der Brutto-Lumineszenzsignale, also vor Abzug der Background-Signale, längs der Zeile 5 der Messbereiche, dargestellt.

Beispiel 5

a) Sensorplattformen

(i) Es wurde eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 16 mm Breite x 48 mm Länge x 0.7 mm Dicke verwendet. Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b)) bestand aus AF 45 Glas (Brechungsindex $n = 1.52$ bei 633 nm). Die optisch transparente Schicht (a) auf der optisch transparenten Schicht (b) aus Ta_2O_5 wurde durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern erzeugt und hatte einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Zusätzlich enthielt die Sensorplattform 2 diskrete Gitterstrukturen, von jeweils einer Periode von 360 nm, mit gleicher Anordnung wie in Beispiel 1a) (Abmessungen von 5 mm Länge x 12 mm Breite bzw. 1 mm Länge x 12 mm Breite, mit Tiefen von 12 ± 3 nm). Die Gitterstrukturen wurden im nachfolgend beschriebenen Messverfahren allerdings nicht verwendet, weder zu einer Luminenzanregung noch zu einer Lumineszenzdetektion.

(ii) Es wurde eine Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 16 mm Breite x 48 mm Länge x 0.7 mm Dicke verwendet, mit ähnlichen physikalischen Parametern wie Beispiel 1.b). Das Substratmaterial (optisch transparente Schicht (b)) bestand aus AF 45 Glas (Brechungsindex $n = 1.52$ bei 633 nm). Im Substrat war mittels holographischer Belichtung der mit aufgeschleudertem Photolack bedeckten wellenleitenden Schicht (a) und anschliessendes nasschemisches Ätzen eine durchgehende Struktur eines Oberflächenreliefgitters einer Periode von 360 nm und einer Tiefe von wiederum 25 ± 5 nm erzeugt worden, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zur ausgewiesenen Breite der Sensorplattform. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) auf der optisch transparenten Schicht (b) aus Ta_2O_5 war durch reaktives, magnetfeldunterstütztes DC-Sputtern (siehe DE 4410258) erzeugt worden und hatte einen Brechungsindex von 2.15 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Unter Einkoppelbedingungen kann Anregungslicht von 633 nm unter einem Winkel von etwa $+3^\circ$ in die Struktur eingekoppelt werden; Einkopplung oder Auskopplung von Licht mit einer Wellenlänge von 670 nm (entsprechend dem Maximum der Fluoreszenz von Cy5) erfolgt unter einem Winkel von etwa -6° .

Zur Vorbereitung auf die Immobilisierung der biochemischen oder biologischen oder synthetischen Erkennungselemente wurden die Sensorplattformen 5.a) (i) und (ii) gereinigt und mit Epoxysilan in Flüssigphase (10 ml (2 % v/v) 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und 1 ml (0.2 % v/v) N-Ethyl-diisopropylamin in 500 ml ortho-Xylol silanisiert (7 Stunden bei 70°C). Danach wurden mit einem kommerziellen Spotter (Genetic Microsystems 417 Arrayer) Lösungen von fluoreszenzmarkierten 18-mer Oligonukleotiden (Cy5-5'-CCGTAACCTCATGATATT-3'-NH₂) ($18 \times \text{Cy5-NH}_2$) jeweils zwei Arrays von jeweils 16×8 Spots (8 Reihen x 16 Spalten) aufgebracht (50 pl pro Spot). Die Konzentration der aufgetragenen Lösungen betrug dabei alternierend pro Reihe 10^{-7} bzw. 10^{-8} M $18 \times \text{Cy5-NH}_2$, so dass die erzeugten Spots (ca. 125 μm Durchmesser in einem Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von 375 μm) Fluorophorkonzentrationen von etwa 100 bzw. 10 Fluorophoren pro μm^2 aufwiesen.

Die Spot-Arrays von jeweils ca. 3.2 mm Breite x 5.8 mm Länge waren auf den Sensorplattformen hintereinander in einem Abstand von 3.3 mm angeordnet, so dass im Falle der Sensorplattform (i) beide Arrays einen Abstand von mehreren Millimetern zu den nächsten Koppelgittern hatten.

b) Optisches System

Die Intensität der Fluoreszenzintensität in den Spotarrays auf den Sensorplattformen (i) und (ii) wurde mit einem kommerziellen Scanner (Genetic Microsystems 418 Array Scanner), unter Einstrahlung des Anregungslichts in einer Auflichtanordnung mit konvergentem Anregungslichtbündel, gemessen. Dabei war die optische Achse des Anregungslichtbündels senkrecht zur Sensorplattform ausgerichtet. Die Anregungslichtintensität betrug etwa 5 mW. Die numerische Apertur der Objektiv-Linse des Laser-Scanners beträgt, was einem halben Öffnungswinkel von etwa 53° entspricht. Die Scan-Geschwindigkeit entsprach der Angabe im Produktkatalog (18 mm/min bei einer Scan-Breite von 22 mm).

Zu einem weiteren Vergleich wurde die Fluoreszenz aus den Messbereichen der Sensorplattform (i) (mit Gitterstrukturen I und II) unter Einkoppelbedingungen, mit einem parallelen Anregungslichtbündel und Einkopplung am rechten Rand der Gitterstruktur I (1 mm Länge x 12 mm Breite; Einkoppelwinkel $+3^\circ$) gemessen. Dabei wurde eine Anregungseinheit gemäss Beispiel 2 / Anregungseinheit a.ii (mit Zylinderlinse aufgeweiteter Anregungsstrahl eines Helium-Neon-Lasers, 0.6 mW) in Kombination mit einer Detektionseinheit gemäss Beispiel 2.b)(i)(I) verwendet.

c) Messergebnisse

Eine Auswahl der Messergebnisse ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Signale (Netto-Fluoreszenzsignale als Differenz von Gesamtsignalen und lokalen Untergrundsignalen), Untergrundsignale und Rauschen wurden aus vier Teilbereichen mit jeweils 10 benachbarten Spots gleicher Fluorophorkonzentration (10 Fluorophore pro μm^2) im Falle der Auflichtanregung mit den Sensorplattformen (i) und (ii) bzw. zwei solchen Teilbereichen im Falle der evaneszenten Anregung, d. h. Einkopplung des Anregungslichts zu den Messbereichen auf dem unstrukturierten Teil der Sensorplattform (i), bestimmt.

Mit der Sensorplattform (ii), mit Messbereichen auf dem über die gesamte Plattform modulierten, monodiffraktiven Gitter, werden in der Konfiguration der Auflichtanregung deutlich höhere Fluoreszenzsignale beobachtet als mit der Sensorplattform (i), welche im Gebiet der Messbereiche keine Gitterstruktur aufweist. Unter den Versuchsbedingungen kann eine Einkopplung von Anregungslicht in die optisch transparente, wellenleitende Schicht (a) im Falle der Sensorplattform (i) vollständig ausgeschlossen, im Falle der Sensorplattform (ii) weitgehend vernachlässigt werden, da angesichts des stark konvergenten Anregungsstrahlenganges nur ein sehr kleiner Anteil unter einem solchen Winkel auf die Gitterstruktur auftrifft, dass es zu einer Einkopplung koppeln kann. Die deutliche Erhöhung der beobachteten Fluoreszenzintensität ist dadurch zu erklären, dass ein erheblicher Anteil der nichtevaneszent angeregten Fluoreszenz von den im Nahfeld der optisch transparenten Schicht (a) befindlichen Fluorophoren in diese einkoppelt. Über die durchgehend modulierte Gitterstruktur wird er jedoch nach einer sehr kurzen Lauflänge, welche abhängig ist von der Tiefe der Gitterstruktur, wieder ausgekoppelt. Da die Auskopplung aufgrund der gegebenen Parameter der Sensorplattform unter einem Winkel von etwa -6° erfolgt, wird der ausgekoppelte Anteil aufgrund der hohen numerischen Apertur des Objektivs vom Detektor mit erfasst. Ein gewisser Anteil der beobachteten Lumineszenzerhöhung mag zusätzlich einem kleinen Anteil eingekoppelten Anregungslichts zuzuschreiben sein. Die hohe Effizienz der Auskopplung zeigt sich darin, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Untergrundsignalen gibt, so dass ein Übersprechen von rückgekoppeltem Fluoreszenzlicht in benachbarte Messbereiche erfindungsgemäss wirksam verhindert werden kann.

Im Falle der Sensorplattform (i) wird ein ebenso grosser Anteil von Lumineszenzlicht in die Schicht (a) einkoppeln, da sie die gleichen Parameter aufweist. Jedoch kann hier eingekoppeltes Fluoreszenzlicht nur über die ausserhalb des Gesichtsfeldes des Detektors befindlichen Gitterstrukturen auskoppeln oder an den Stimflächen der Sensorplattform austreten.

Die Messungen bei der höheren Fluorophorkonzentration ergaben mit beiden Sensorplattformen etwa zehnfach höhere Fluoreszenzsignale und Signal / Rauschen-Verhältnisse. Das Verhältnis von Nettosignal zum Rauschen kann durch mehrfaches Scannen, mit entsprechend verlängerter Messzeit (im Beispiel 10 Minuten statt 1 Minute für 10-faches Scannen) noch verbessert werden, in diesem Beispiel um etwa einen Faktor 3.

Die Vergleichsmessung mit der Sensorplattform (i) unter Einkoppelbedingungen zeigt, dass mit dieser erfindungsgemässen Anordnung die Empfindlichkeit bei wesentlich schwächerem Anregungslicht nochmals erheblich, nämlich unter diesen Bedingungen um einen Faktor 5 bis 12, in Abhängigkeit von der Belichtungszeit, gesteigert werden kann. Zugleich sind, wie aus den beispielhaften Bedingungen ersichtlich, für diese Methode wesentlich kürzere Messzeiten notwendig.

Tabelle 3:

	Auflichtanregung: Scanner 418		Evaneszente Anregung, Plattform (i)		
	Plattform (i)	Plattform (ii)	1 sec	3 sec	10 sec
Netto- signal	196 +/-34	905 +/-228	541 +/- 21	1511 +/- 83	4097 +/-263
Unter- grund	253 +/-8	237 +/-6	86 +/-5	241 +/- 15	683 +/-47
Rauschen	144 +/-4	164 +/-2	19.8 +/-0.4	30.5 +/-2.7	62 +/- 12
Signal / Rauschen	1.4 +/-0.3	5.5 +/-1.3	27.3 +/-0.5	49.6 +/-1.6	67 +/- 8

Patentansprüche

1. Sensorplattform zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
- mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)
- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass ein Übersprechen von in den Messbereichen oder in den mehrere Messbereiche umfassenden Segmenten erzeugt und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder benachbarte Segmente mittels an die Messbereiche oder an die Segmente angrenzender Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Periode wie die Gitterstrukturen (c) zur Auskopplung des Lumineszenzlichts verhindert wird.

2. Sensorplattform nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstrukturen (c) und (c') wechselseitig als Ein- und oder Auskoppelgitter verwendet werden können.

3. Sensorplattform nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstrukturen (c) und (c') räumlich getrennte Messbereiche (d) oder räumlich getrennte Segmente (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, umschliessen, bevorzugt in einer kreis-, rechteck- oder polygonförmigen Anordnung um die Messbereiche.

4. Sensorplattform nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterlinien der Gitterstrukturen (c) und (c') parallel zueinander ausgerichtet sind.
5. Sensorplattform nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstrukturen (c) und (c') eine gemeinsame durchgehende Gitterstruktur bilden, auf der sich mehrere Messbereiche oder Segmente befinden.
6. Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter
- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
 - mit einer im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereiche oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmente (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)
 - mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
 - auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,
- dadurch gekennzeichnet, dass
- die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und
 - ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche oder Segmente durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

7. Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),

mit einer im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereiche oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmente (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c)

- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und

ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

8. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 5 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass die im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder Segmente durchgehend modulierte Gitterstruktur eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien ist, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

9. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.

10. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselementen (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus der Gruppe Silane, Epoxide und "selbstorganisierte funktionalisierte Monoschichten" umfasst.

11. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting, mechanischem Spotting, micro contact printing, fluidische Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen", gebildet wird.

12. Sensorplattform nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (DNA, RNA, ...) und Nukleinsäureanaloge (PNA ...), Antikörpern, Aptameren, membrangebundenen und isolierten Rezeptoren, deren Liganden, Antigene für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten", durch chemische Synthese erzeugte Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird, oder dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselementen ganze Zellen oder Zellfragmente aufgebracht werden.

13. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 11 - 12, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen von Rinderserumalbumin bzw. Polyethylenglycol, zur Verminderung unspezifischer Bindung oder Adsorption aufgebracht sind.

14. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 13, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere räumlich getrennte Messbereiche jeweils zu Segmenten auf der Sensorplattform zusammengefasst sind und dass bevorzugt verschiedene Segmente zusätzlich durch eine aufgebrachte Berandung, welche zur fluidischen Abdichtung gegen Nachbarbereiche und / oder zu einer weiteren Verminderung optischen Übersprechens zwischen benachbarten Segmenten beiträgt, gegeneinander abgegrenzt sind.

15. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 14, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von $0.001 - 6 \text{ mm}^2$ einnimmt.

16. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter ist.

17. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

18. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe besteht, die von Polycarbonat, Polyimid oder Polymethylmethacrylat gebildet wird.

19. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 2 ist.

20. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass die erste optisch transparente Schicht (a) aus TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 , oder ZrO_2 , besonders bevorzugt aus TiO_2 und Ta_2O_5 besteht.

21. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 bis 300 nm, vorzugsweise 70 – 160 nm beträgt.

22. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 30 nm beträgt.

23. Sensorplattform nach Anspruch 5 oder 6 und einem der Ansprüche 9 - 21, dadurch gekennzeichnet, dass durch unvollständige Ein- und Auskopplung von Anregungs- und / oder rückgekoppeltem Lumineszenzlicht parallel zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts ein über die Gittertiefe kontrollierbarer positiver Gradient der Intensität des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche erzeugt wird.

24. Sensorplattform nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Gitter (c) in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts eine räumlich variierende Gittertiefe aufweist.

25. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass parallel zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts ein über dessen Ausbreitungsverluste in der optisch transparenten Schicht (a) kontrollierbarer negativer Gradient der Intensität des geführten Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche erzeugt wird.

26. Sensorplattform nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

27. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 – 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.

28. Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 – 27, dadurch gekennzeichnet, dass auf ihr optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

29. Optisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 – 28
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

30. Optisches System nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.

31. Optisches System nach Anspruch 29 oder Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

32. Optisches System nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

33. Optisches System nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt

wird, wobei dieses bevorzugt unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) erfolgt.

34. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf räumlich getrennte Messbereiche eingestrahlt werden.

35. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 34, dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere kohärente Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

36. Optisches System nach Anspruch 35 mit einer Sensorplattform nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von 2 oder mehr kohärenten Lichtquellen gleichzeitig oder sequentiell aus verschiedenen Richtungen auf eine Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird, welche eine Überlagerung von Gitterstrukturen mit unterschiedlicher Periodizität umfasst.

37. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 36, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultiplier gebildet wird.

38. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 37, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 28 und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen

Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

39. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt und das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

40. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 39, dadurch gekennzeichnet, dass zur Referenzierung Lichtsignale aus der Gruppe gemessen werden, die von Anregungslicht am Ort der Lichtquellen oder nach ihrer Aufweitung oder nach ihrer Unterteilung in Teilstrahlen, Streulicht bei der Anregungswellenlänge aus dem Bereich der einen oder mehreren räumlich getrennten Messbereiche, und über die Gitterstruktur (c) neben den Messbereichen ausgekoppeltem Licht der Anregungswellenlänge gebildet werden.

41. Optisches System nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche zur Bestimmung des Emissionslichts und des Referenzsignals identisch sind.

42. Optisches System nach einem der Ansprüche 29 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt.

43. Optisches System nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.

44. Optisches System nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

45. Optisches System nach einem der Ansprüche 42 - 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.

46. Analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer Sensorplattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter, mit

- einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 1 - 28,
- einem optischen System nach einem der Ansprüche 29 - 45,
- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den

Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

47. Analytisches System nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, dass dieses zusätzlich eine oder mehrere Probenbehältnisse umfasst, welche mindestens im Bereich der einen oder mehreren Messbereiche oder der zu Segmenten zusammengefassten Messbereiche zur Sensorplattform hin geöffnet sind, wobei die Probenbehältnisse vorzugsweise jeweils ein Volumen von 0.1 nl - 100 µl haben.

48. Analytisches System nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite, mit Ausnahme von Ein- und / oder Auslassöffnungen für die Zufuhr oder den Auslass der Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien, geschlossen sind und die Zufuhr oder der Auslass von Proben und gegebenenfalls zusätzlicher Reagentien in einem geschlossenen Durchflusssystem erfolgen, wobei im Falle der Flüssigkeitszufuhr zu mehreren Messbereichen oder Segmenten mit gemeinsamen Einlass- und Auslassöffnungen diese bevorzugt spalten- oder zeilenweise adressiert werden.

49. Analytisches System nach Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal adressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

50. Analytisches System nach einem der Ansprüche 47 - 49, dadurch gekennzeichnet, dass Behältnisse für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benetzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden

51. Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen auf einer Sensorplattform zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von einem Array aus mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
- mit einer oder mehreren Gitterstrukturen (c) zur Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d)
- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass ein Übersprechen von in den Messbereichen oder in den mehrere Messbereiche umfassenden Segmenten erzeugt und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder benachbarte Segmente mittels an die Messbereiche oder an die Segmente angrenzender Gitterstrukturen (c') mit gleicher oder unterschiedlicher Periode wie die Gitterstrukturen (c) zur Auskopplung des Lumineszenzlichts verhindert wird.

52. Verfahren zum gleichzeitigen Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in einer oder mehreren Proben auf einem mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen auf einer Sensorplattform zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen von mindestens zwei oder mehr, räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, auf dieser Plattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter

- mit einer ersten optisch transparenten Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a),
- mit einem im Bereich der mindestens zwei oder mehr Messbereichen oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, durchgängig modulierten Gitterstruktur (c)
- mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Messbereichen (d) oder mindestens zwei oder mehr räumlich getrennten Segmenten (d'), in die mehrere Messbereiche zusammengefasst sind, und
- auf diesen Messbereichen immobilisierten, gleichen oder unterschiedlichen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen (e) zum qualitativen oder quantitativen Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer mit den Messbereichen in Kontakt gebrachten Probe,

dadurch gekennzeichnet, dass

- die Dichte der Messbereiche auf der Sensorplattform mindestens 16 Messbereiche pro Quadratzentimeter beträgt und
- ein Übersprechen von in den Messbereichen oder innerhalb eines Segments erzeugter und in die optisch transparente Schicht (a) des Schichtwellenleiters rückgekoppelter Lumineszenz in benachbarte Messbereiche oder Segmente mittels Auskopplung dieses Lumineszenzlichts durch die im Bereich der betreffenden Messbereiche oder Segmente durchgehend modulierte Gitterstruktur (c) verhindert wird.

53. Verfahren nach Anspruch 52, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.

54. Verfahren zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen nach einem der Ansprüche 51 - 53, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

55. Verfahren zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 23 - 25, dadurch gekennzeichnet, dass mittels eines kontrollierbaren Gradienten des geführten

Anregungs- und / oder angeregten Lumineszenzlichts innerhalb eines einzelnen und / oder über mehrere Messbereiche, parallel zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, der dynamische Bereich für die Signalerfassung und / oder quantitative Analytbestimmung erweitert oder beschränkt werden kann.

56. Verfahren nach einem der Ansprüche 41 - 55, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

57. Verfahren nach Anspruch 56, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen gebunden ist.

58. Verfahren nach Anspruch 56 oder 57, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden

59. Verfahren nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden kann, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

60. Verfahren nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.

61. Verfahren nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.

62. Verfahren nach einem der Ansprüche 51 – 61, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.

63. Verfahren nach einem der Ansprüche 51 – 62, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

64. Verfahren nach einem der Ansprüche 51 – 63 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

65. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 51 – 64, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen entnommen sind.

66. Verwendung eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 51 – 65 zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärmedizin, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen

Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Abbildung 1:

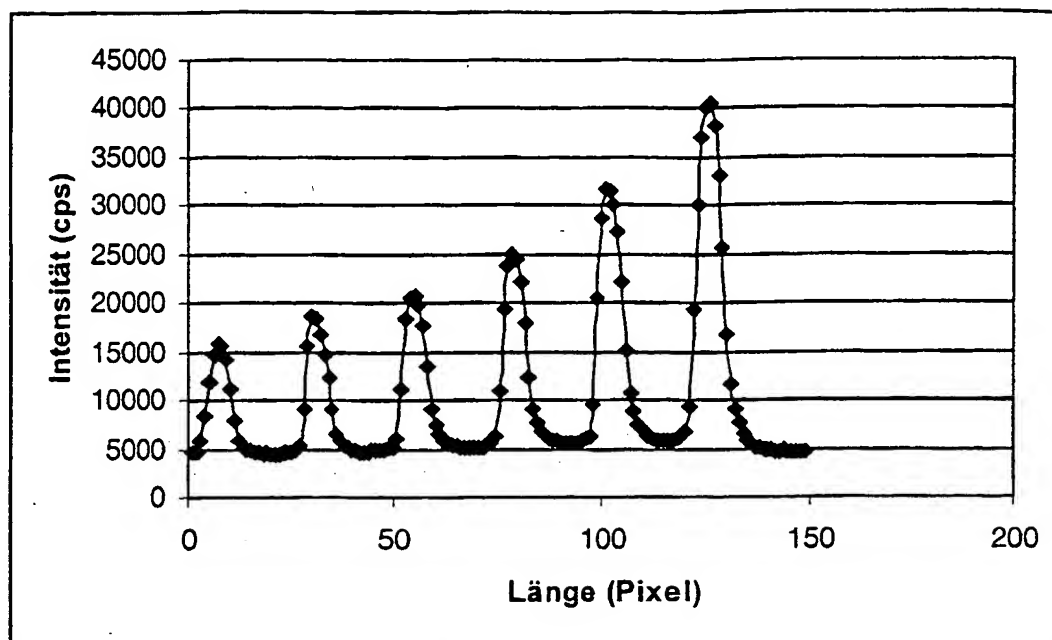


Abbildung 2:

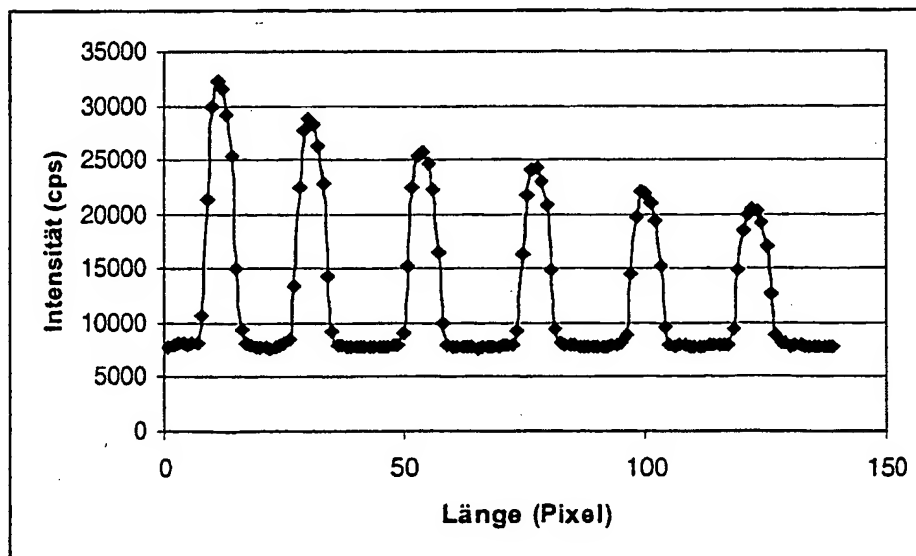


Abbildung 3:

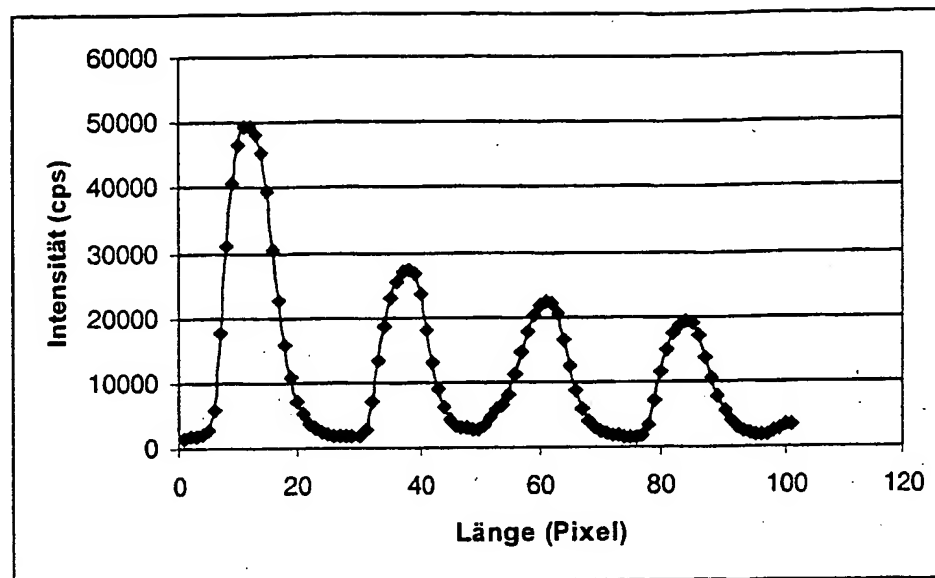
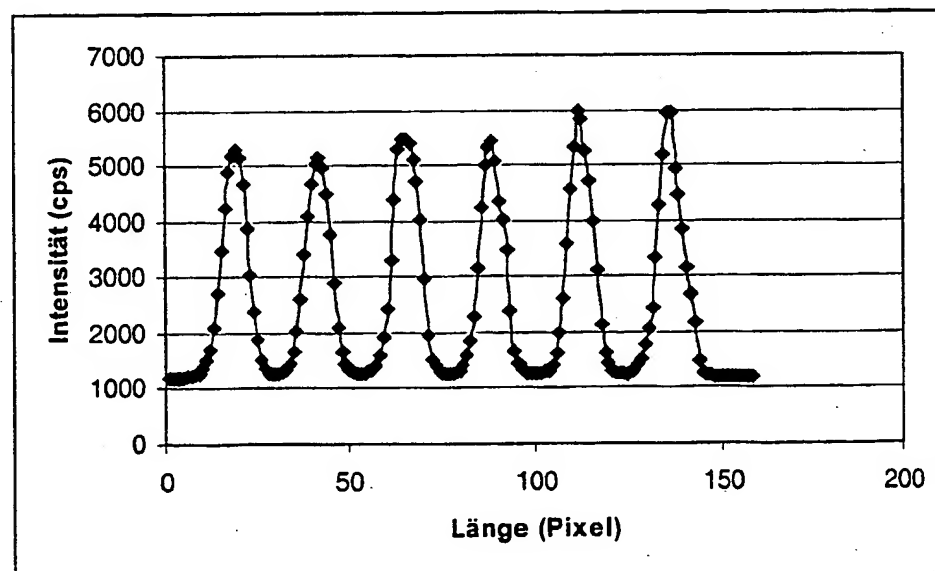


Abbildung 4:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/04869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 082 629 A (GOLDMAN DON S ET AL) 21 January 1992 (1992-01-21) figure 5	1-66
A	US 5 779 978 A (HARTMANN PAUL ET AL) 14 July 1998 (1998-07-14) figures 1-3	1-66

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9913320	A	18-03-1999	EP 1012580 A	28-06-2000
US 5738825	A	14-04-1998	DE 69420375 D	07-10-1999
			DE 69420375 T	18-05-2000
			EP 0660924 A	05-07-1995
			JP 8504955 T	28-05-1996
			WO 9503538 A	02-02-1995
WO 9821571	A	22-05-1998	AU 5479998 A	03-06-1998
			BR 9712934 A	28-03-2000
			EP 1021708 A	26-07-2000
EP 0455067	A	06-11-1991	CA 2041438 A	04-11-1991
			JP 3071859 B	31-07-2000
			JP 5346398 A	27-12-1993
			US 5455178 A	03-10-1995
US 5082629	A	21-01-1992	CA 2072588 A	30-06-1991
			EP 0507883 A	14-10-1992
			JP 6502012 T	03-03-1994
			WO 9110122 A	11-07-1991
US 5779978	A	14-07-1998	AT 403745 B	25-05-1998
			AT 38396 A	15-09-1997
			EP 0793090 A	03-09-1997
			EP 0987539 A	22-03-2000
			JP 3054756 B	19-06-2000
			JP 9325116 A	16-12-1997

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N21/77 G01N21/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 13320 A (TIEFENTHALER KURT ;ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH)) 18. März 1999 (1999-03-18) Seite 3 -Seite 7; Abbildungen 1-3 Seite 21 -Seite 27	1-66
X	US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL) 14. April 1998 (1998-04-14) Abbildungen 5A-5F,,6A-6B,,7A-7G	1-66
A	WO 98 21571 A (BINDER ANDRES ;CIBA GEIGY AG (CH); EHRAT MARKUS (CH); OROSZLAN PET) 22. Mai 1998 (1998-05-22) Seite 10 -Seite 12; Abbildungen 3-6	1-66
A	EP 0 455 067 A (HOFFMANN LA ROCHE) 6. November 1991 (1991-11-06) Abbildungen 4,5	1-66

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

g Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mason, W

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 082 629 A (GOLDMAN DON S ET AL) 21. Januar 1992 (1992-01-21) Abbildung 5	1-66 -
A	US 5 779 978 A (HARTMANN PAUL ET AL) 14. Juli 1998 (1998-07-14) Abbildungen 1-3	1-66

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9913320 A	18-03-1999	EP 1012580 A	28-06-2000
US 5738825 A	14-04-1998	DE 69420375 D	07-10-1999
		DE 69420375 T	18-05-2000
		EP 0660924 A	05-07-1995
		JP 8504955 T	28-05-1996
		WO 9503538 A	02-02-1995
WO 9821571 A	22-05-1998	AU 5479998 A	03-06-1998
		BR 9712934 A	28-03-2000
		EP 1021708 A	26-07-2000
EP 0455067 A	06-11-1991	CA 2041438 A	04-11-1991
		JP 3071859 B	31-07-2000
		JP 5346398 A	27-12-1993
		US 5455178 A	03-10-1995
US 5082629 A	21-01-1992	CA 2072588 A	30-06-1991
		EP 0507883 A	14-10-1992
		JP 6502012 T	03-03-1994
		WO 9110122 A	11-07-1991
US 5779978 A	14-07-1998	AT 403745 B	25-05-1998
		AT 38396 A	15-09-1997
		EP 0793090 A	03-09-1997
		EP 0987539 A	22-03-2000
		JP 3054756 B	19-06-2000
		JP 9325116 A	16-12-1997